

**DIE WIRKUNG DER L-ASPARAGINASE AUF DIE
EXPERIMENTELLE ALLERGISCHE
ENCEPHALOMYELITIS (EAE) DES
MEERSCHWEINCHENS**

Michael Thiersch

1973

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

AUS DER NEUROLOGISCHEN KLINIK UND POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. med. A. Schrader

DIE WIRKUNG DER L-ASPARAGINASE AUF DIE EXPERIMENTELLE ALLER-
GISCHE ENCEPHALOMYELITIS (EAE) DES MEERSCHWEINCHENS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Michael Thiersch

aus Tann/Ndb.

1973

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Frick
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. A. Schrader
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	3.7.1973



Inhaltsübersicht

	Seite
A) Einleitung	1
B) Material und Methoden	6
I) Versuchstiere	
II) Immunisierung	
III) Verwendete Asparaginase	
IV) Behandlungsschema. Beobachtung und Beurteilung der Tiere	
V) Hauttest	
C) Ergebnisse	11
I) Die Wirkung der Asparaginase auf die EAE.	
II) Ergebnisse der Hauttestung	
D) Diskussion	31
E) Zusammenfassung	47
F) Verwendete Literatur	49

Digitized by the Internet Archive
in 2026

A) Einleitung

Die experimentelle allergische Encephalomyelitis (EAE) ist eine im Tierversuch experimentell erzeugbare Entmarkungserkrankung. Sie wird durch die Injektion von homologem oder heterologem Gewebe aus dem Zentralnervensystem oder Extrakten aus ihnen bei einer großen Zahl von Tierarten ausgelöst.

Bei der Verabreichung des Antigens bedient man sich gewöhnlich des Freund'schen Adjuvans; das Antigen befindet sich hierbei in der wässrigen Phase der Wasser-in-Öl-Emulsion. Die Auslösung einer EAE ist jedoch auch ohne Verwendung von Adjuvantien möglich, doch sind hierzu bedeutend größere Antigen-Mengen vonnöten, die mit mehrmaligen Injektionen dem Versuchstier verabreicht werden müssen (60).

Üblicherweise kommt es nach der Sensibilisierung mit einem geeigneten Antigen in komplettem Freund'schen Adjuvans nach einer etwa 2wöchigen Latenzzeit zum Ausbruch der EAE, die sich klinisch in verschiedenen zentralnervösen Ausfällen wie Paresen etc., pathologisch-anatomisch in auf Gehirn und Rückenmark beschränkten perivenösen Entzündungsherden mit nachfolgender Entmarkung manifestiert (5, 165, 171). Die Erscheinungsform der EAE ist jedoch von Tierart zu Tierart etwas verschieden, ebenso bestehen stärkere Unterschiede zu menschlichen Entmarkungserkrankungen wie der postvaccinalen Encephalitis, die in ihrem histologischen Bild und in ihrer einphasigen Verlaufsform der EAE am nächsten steht (60, 171).

Die multiple Sklerose des Menschen ist durch ihren chronischen Verlauf und ihr histopathologisches Bild deutlich von der EAE abgrenzbar (133).

Man ist sich heute weitgehend darüber einig, daß der Vorgang, der zu den klinisch und histologisch nachweisbaren pathologischen Veränderungen in der EAE führt, als eine verzögerte Immunreaktion (Allergie) gegen Bestandteile des ZNS anzusehen ist. Ein aus Markscheiden gewonnenes basisches Protein hat gegenüber anderen isolierbaren Substanzen die stärkste encephalitogene Potenz. Dieses sogenannte Encephalitogen Protein (EP), das organspezifisch aber nicht artspezifisch ist, erzeugt schon im μ g-Bereich bei Versuchstieren eine EAE,

wenn es zusammen mit dem Freund'schen Adjuvans verabreicht wird (36, 91, 92). Es wird deshalb heute als dasjenige zentralnervöse Antigen aufgefaßt, gegen das sich die verzögerte Immunreaktion richtet (91, 92). Für die Bedeutung der zellulären Immunreaktionen bei der Entstehung der EAE sprechen zahlreiche experimentelle Befunde:

1. Das histologische Bild der EAE ist durch die Infiltration mononukleärer Immunzellen (Lymphozyten und Makrophagen) in die um die kleinen Venolen gelegenen Bereiche gekennzeichnet (89, 90, 122, 171). Die Anwesenheit dieser Zellen scheint für die Entstehung der Entmarkungsherde notwendig zu sein (125).
2. Die verzögerte Hautreaktion, die man nach Art einer Tuberkulinreaktion am sensibilisierten Tier durch die intrakutane Applikation einer geringen Menge von Encephalitogenem Protein prüft, entspricht in ihrer Erscheinung und in ihrem histologischen Aufbau der Tuberkulinreaktion in der Haut tuberkulinpositiver Versuchstiere (80, 153). Sie korreliert in ihrer Stärke gut mit dem nachfolgenden EAE-Verlauf, wenn man den Hauttest vor dem Beginn der klinischen Erkrankung durchführt (153).
3. Zahlreiche weitere in-vitro-Reaktionen unterstreichen die Bedeutung der zellulären Immunphänomene für die Pathogenese der EAE: Nach Rauch und Raffel (138) reagieren Lymphozyten von Meerschweinchen mit einer EAE spezifisch mit Encephalitogenem Protein.
Lymphozyten aus Lymphknoten oder mononukleäre Zellen aus dem Blut oder der Lymphe von an EAE erkrankten Tieren üben, wenn sie in Gliazellkulturen eingebracht werden, einen cytotoxischen Effekt auf die Gliazellen aus (18, 19, 80, 88).
- Die Makrophagenwanderung, die man an Zellen des Peritonealexsudats von Tieren (Meerschweinchen und Ratten) mit EAE prüft, ist durch das Encephalitogene Protein hemmbar, eine Reaktion, die für die Allergie vom verzögerten Typ spezifisch ist (28, 45).
4. Die EAE ist mit mononukleären Zellen aus Lymphknoten, Milz oder Blut von sensibilisierten oder schon klinisch erkrankten Tieren auf histokompatible

Empfänger übertragbar (125, 157). Eine Übertragung mit dem Serum oder der -Globulinfraktion dagegen gelingt nicht (130).

5. Das Freund'sche Adjuvans führt zu der Aktivierung vor allem der zellulären Immunität.

Gegenüber den Phänomenen der zellulären Immunreaktionen ist die Bedeutung humoraler Antikörper für die Pathogenese der EAE von wohl sekundärer Bedeutung, wenn auch noch weitgehend ungeklärt (122, 127). Gegen Antigene des ZNS treten Antikörper verschiedener Art im Serum immunisierter Tiere auf. Ihre Menge, ihre Art, und ihre Spezifität hängen jedoch weitgehend von der Art des zur Immunisierung verwendeten Antigens und der Immunisationsweise ab. Ihr Auftreten ist für das Zustandekommen einer EAE nicht notwendig:

1. Mit EP oder einem stark encephalitogenen Polypeptid aus Rinderrückenmark konnte beim Meerschweinchen eine EAE ohne nachweisbare Antikörperbildung erzeugt werden (36, 91, 92).
2. Eine EAE tritt ebenfalls bei Küken mit Antikörpermangelsyndrom auf.
3. Ein sicherer Zusammenhang zwischen dem Auftreten der EAE und ihrem Verlauf und dem Serumtiter von Antikörpern gleich welcher Spezifität und Art besteht nicht (171).

Dies gilt auch für den von Bornstein und Appel 1961 (24) im Serum von an EAE erkrankten Kaninchen nachgewiesenen Antikörper mit myelotoxischer und gliotoxischer Wirksamkeit.

Für verschiedene andere Antikörper (komplementfixierende, hämagglutinierende ua.) konnte ebenfalls keine sichere Beziehung zur Pathogenese der EAE nachgewiesen werden (36, 37).

Dagegen ist für einige dieser Antikörper eine Schutzwirkung gegen die EAE wahrscheinlich gemacht worden (37, 127).

Die EAE als autoallergische Erkrankung ist durch Immunsuppression zu beeinflussen. Röntgenbestrahlung, Kortikosteroide und Antimetabolite können die EAE abmildern oder zum Teil völlig verhindern, wenn die Behandlung vor, zum Zeitpunkt der Immunisierung, oder in der Latenzzeit begonnen wurde (27, 35, 39, 57, 64, 78, 87, 126, 128). Eine schon ausgebrochene EAE dagegen konnte bisher nur mit dem Antilymphozytenserum wirkungsvoll behandelt werden, das

eine direkte zerstörende Wirkung auf die immunologisch kompetenten Zellen ausübt (93, 140).

Die L-Asparaginase ist ein Enzym, das im Serum einiger Nagerarten wie Meerschweinchen und Agouti vorkommt (121).

Die L-Asparaginase ist eine Amidohydrolase, die die Zerlegung von L-Asparagin in Asparaginsäure und Ammonium katalysiert (15). Ihre Entdeckung in *Escherichia coli* und einigen anderen Bakterien ermöglichte die quantitative Darstellung in größerem Umfang für Klinik und Experiment (15).

L-Asparaginase hemmt das Wachstum von einigen tierischen und menschlichen Neoplasien, insbesondere Leukämien, und hier wiederum vorzüglich von solchen aus der lymphatischen Reihe (65, 66, 119, 145). Die Wirkung der Asparaginase auf empfindliche neoplastische Zellen beruht auf der Tatsache, daß diese auf Grund eines Enzymdefekts das für den Zellstoffwechsel benötigte Asparagin nicht selbst synthetisieren können, sondern aus dem Extrazellulärraum beziehen.

Die Asparaginase zerstört dieses extrazelluläre Asparagin. Es kommt dadurch zu Störungen vorwiegend der Proteinbiosynthese (33, 73, 118, 119, 145, 155), jedoch auch zu Veränderungen im RNS- und DNS-Stoffwechsel und schließlich möglicherweise zum Untergang der Zellen (73, 118, 155).

Die intrazelluläre Synthese des Asparagins aus Asparaginsäure und Ammonium oder Glutamin wird unter ATP-Verbrauch von dem Enzym Asparagin-Synthetase katalysiert (65). Die Aktivität des Enzyms in den Zellen steigt bei der Asparaginase-Behandlung oder bei der in-vitro-Züchtung im asparaginfreien Kulturmedium unterschiedlich stark an (134). Hierbei besteht eine direkte Korrelation zwischen der bei Asparaginasebehandlung oder Asparagindeprivation erreichten Aktivität der Asparagin-Synthetase von Zellen und ihrer Asparaginaseempfindlichkeit. Nur neoplastische Zellstämme mit verminderter oder aufgehobener Asparagin-Synthetase-Aktivität sprechen auf eine Behandlung an (32, 77, 134).

Aus primär empfindlichen Zellstämmen können sich Mutanten entwickeln, die gegen die Asparaginase resistent sind. Die bei ihnen gemessenen Asparagin-

Synthetase -Aktivitäten entsprechen denjenigen von unempfindlichen normalen Zellen (132).

Die Hoffnung, mit der Asparaginase ein Mittel zu besitzen, das selektiv auf Tumorzellen wirkt, hat sich nicht erfüllt.

Trotz der verhältnismäßig geringen Toxizität der Asparaginase, die sich auch in den im Vergleich zu den bei der Therapie von Neoplasien verwendeten Dosierungen sehr großen 50 %-Letaldosen (DL_{50}) von mehr als 200 000 IU/kg bei Ratte und Maus und ungefähr 50 000 IU/kg beim Hund kundtut (108), kommt es doch bei der Behandlung zu z. T. erheblichen Störungen der normalen Körperfunktionen (71, 95, 119, 145). Besonders Zellen mit hohem Stoffwechsel, z. B. schnell proliferierende Gewebe sind betroffen (1, 16, 65, s. auch Diskussion). Die Asparaginsynthese dieser Zellen reicht offenbar nicht aus, um den gesteigerten Bedarf zu decken.

Die Asparaginase unterscheidet sich somit in ihrem Wirkungsspektrum nicht grundsätzlich von anderen Antimetaboliten (70).

So lag es nahe, die Asparaginase auf ihre immunsuppressive Wirksamkeit hin zu untersuchen. Sie hat sich tatsächlich in zahlreichen Untersuchungen als stark immunsuppressiv erwiesen (s. Diskussion). Ihre ausgezeichnete Wirkung auf die EAE der Lewis-Ratte (9) ließ uns einen Behandlungsversuch bei der Meerschweinchen-EAE aussichtsreich erscheinen.

B) Material und Methoden

I. Versuchstiere

Versuchstiere waren männliche oder weibliche Meerschweinchen, die alle von einem Züchter stammten. Nach Möglichkeit verwendeten wir weiße Tiere, um den Hauttest besser durchführen zu können. Das Gewicht der Tiere schwankte von 225 bis 700 g, differierte aber innerhalb einer Gruppe um nicht mehr als 200 g. Je 10 Tiere gleichen Geschlechts bildeten eine Untersuchungsgruppe und wurden zusammen in einem Käfig gehalten. Als Nahrung erhielten die Tiere ein Fertigfutterpräparat (Handelsname Altromin) und Wasser nach Belieben.

II. Immunisierung

Zur Immunisierung verwendeten wir heterologes Rückenmark vom Rind. Das Rückenmark wurde mit sterilem Besteck aus dem Durasack gelöst, und die anhängenden Meningen und Blutgefäße entfernt. Anschließend wurde es mit gleichen Gewichtsteilen Freund'schen Adjuvans, bestehend aus 85 % Bayol F (Serva, Heidelberg) und 15 % Arlacel (Serva, Heidelberg) als Emulgator homogenisiert. Im Bayol F waren hitzegetötete und getrocknete Tuberkelbazillen Typus humanus (selbthergestelltes nichtkäufliches Präparat) suspendiert. Das fertige Antigen enthielt 10 mg Mycobacterium tuberculosis pro ml.

Zur Immunisierung erhielt jedes Tier 0,2 ml des Homogenats intrakutan in die Plantarfläche des linken Hinterfußes. Die Einzeldosis enthielt 2 mg Tuberkelbazillen.

III. Verwendete Asparaginase

Die zur Behandlung verwendete Asparaginase stellte uns die Firma Bayer-Leverkusen zur Verfügung. Es ist ein Präparat, das auch in klinischer Verwendung ist (Handelsname Crasnitin). Das Enzym kommt als kristallines Pulver mit einer Asparaginase-Aktivität von 280 IU/mg in den Handel und ist von Pyrogenen frei.

Zur Injektion lösten wir die Asparaginase in 0,9 % Kochsalzlösung, wobei wir die täglich benötigte Menge stets frisch bereiteten. Die fertige Lösung hatte eine Aktivität von 2000 IU/ml Flüssigkeit. Ein Tier erhielt somit pro Tag je nach Dosierung und Gewicht zwischen ungefähr 0,5 und 3 ml Flüssigkeit intraperitoneal. Die zu injizierende Asparaginase-Menge wurde bei steigendem oder fallendem Gewicht des Tieres jeweils auf das Körpergewicht neu berechnet. Die tägliche Asparaginase-Dosis wurde einmal pro Tag mit einer intraperitonealen Injektion verabreicht.

IV. Behandlungsschema, Beobachtung und Beurteilung der Tiere

80 in oben beschriebener Weise mit Rinderrückenmark immunisierte Tiere waren in 2 unbehandelte Kontrollgruppen und 6 mit Asparaginase behandelte Gruppen zu je 10 Tieren aufgeteilt.

10 weitere nichtimmunisierte Tiere erhielten tägliche Asparaginaseinjektionen über einen Zeitraum von 3 Wochen.

Untersuchungsgruppe	Anzahl der Tiere	Art der Behandlung
I.	10	keine Behandlung (Kontrollen)
II.	10	keine Behandlung (Kontrollen)
III.	10	5 000 IU Asparaginase/kg/Tag von Tag $\pm$ 0 bis + 13.
IV.	10	10 000 IU/kg/Tag von $\pm$ 0 bis + 20
V.	10	10 000 IU/kg/Tag von $\pm$ 0 bis + 20
VI.	10	7 000 IU/kg/Tag von - 7 bis + 20
VII.	10	10 000 IU/kg/Tag von - 7 bis + 20
VIII.	10	10 000 IU/kg/Tag von + 7 bis + 20
IX.	10	8 000 IU/kg/Tag über einen Zeitraum von 3 Wochen (nichtimmunisierte Tiere, negative Kontrollen)

(Der Tag $\pm$ 0 ist jeweils der Tag der Immunisierung.)

Tabelle 1

Untersuchungsgruppe

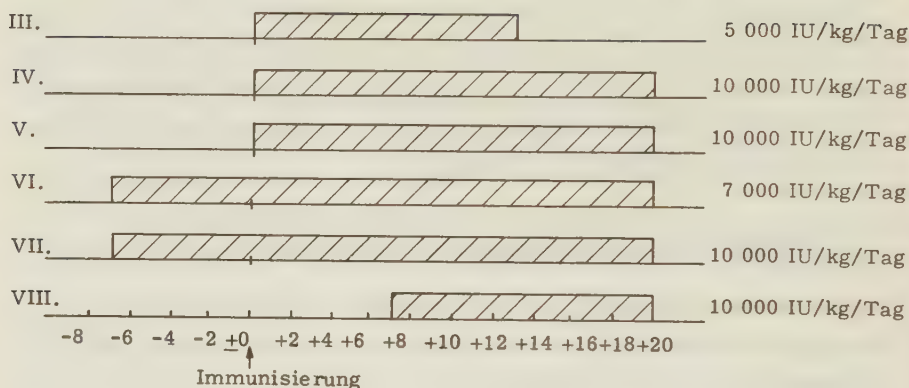


Abb. 1 Therapieschema der immunisierten und mit Asparaginase behandelten Tiere.

Die Tiere wurden täglich auf ihr Allgemeinbefinden und auf Lähmungen hin untersucht und jeden 2. Tag gewogen.

Der plötzliche Gewichtsverlust erwies sich als sicheres Kriterium für eine beginnende EAE. Weitere Kennzeichen der Erkrankung waren: Allgemeine Schwäche; Paresen und Plegien der Extremitäten, Muskelhypotonie, Stuhl- und Harninkontinenz, Gleichgewichtsstörungen, ataktische Gangweise und Krämpfe.

Die Beurteilung der Paresen an den hinteren Extremitäten wurde durch die oft ausgeprägte Schonhaltung erschwert, die bedingt war durch die an der linken Hinterextremität vom Antigendepot ausgehend ablaufenden schweren, ulcerierenden und nekrotisierenden Entzündungen, die am 4. Tag nach der Immunisierung begannen. Diese Entzündungsprozesse führten oft zum Verlust von Zehen und zuweilen Teilen des Vorderfußes.

Zur Registrierung unserer Ergebnisse verwendeten wir folgendes Schema:

0	= gesund
+	= leichte Paresen der hinteren Beine, Schwäche
++	= schwerere Paresen der hinteren Beine
+++	= schwere Lähmungen, Stuhl- und Harninkontinenz
++++	= Tod

Die Anzahl der Kreuze, die nach diesem Bewertungsschema die Tiere einer Gruppe an einem bestimmten Tag erhielten, wurde addiert und durch die Gesamtzahl der Tiere dividiert. Das Ergebnis ist ein Bild der durchschnittlichen Erkrankungsschwere einer Untersuchungsgruppe an einem bestimmten Tag und wird im folgenden als Krankheitsindex bezeichnet.

Wir beschränkten uns bei der Beurteilung der EAE auf die sorgfältige Registrierung der klinischen Symptomatik und verzichteten auf die histologische Untersuchung von Gehirn und Rückenmark, weil die Erfahrung gezeigt hat, daß klinisches und histologisches Bild der EAE sehr gut miteinander korrelieren (5).

Als den Erkrankungsbeginn eines Tieres bestimmten wir den Tag, an dem zum ersten Mal bleibende Paresen, Hypotonie o. ä. auftraten. Waren zweifelhafte Zeichen einer EAE an dem Vortag einer sicheren Erkrankung festzustellen, so wurde er als Termin des Erkrankungsbeginns festgehalten.

Zur Auswertung wurden die Erkrankungstermine aller innerhalb einer Untersuchungsgruppe erkrankten Tiere gemittelt. Dieser Mittelwert ist der durchschnittliche Erkrankungsbeginn einer Untersuchungsgruppe.

V. Der Hauttest. Verwendete Antigene. Auswertung

Ein Hauttest wurde bei allen Tieren der Gruppen I bis VIII mit den unten erwähnten Ausnahmen am 9. oder 10. Tag nach der Immunisierung durchgeführt, zu einem Zeitpunkt, an dem die EAE bei nahezu allen Tieren noch nicht begonnen hatte, aber dicht bevorstand. Nach der Literatur ist dann die Hautreaktion maximal, um sich mit dem Beginn der Lähmungen abzuschwächen. Zur Testung der Hautreaktion verwendeten wir 2 verschiedene Antigene:

1) Eine wässrige Suspension homologen Hirngewebes vom Meerschweinchen mit einer Konzentration von 1 g%.

2) Ein aus bovinem Rückenmark isoliertes encephalitogenes Protein (EP), in wässriger Lösung und mit einer Konzentration von 50 mg%.

Eine Flanke der Tiere wurde rasiert und eine Quaddel mit Meerschweinchenhirngewebe und eine weitere mit EP in ausreichendem Abstand voneinander erzeugt: Es wurden dazu je 0,05 ml Flüssigkeit mit einer 20-Nadel intradermal injiziert, nachdem sich gezeigt hatte, daß mit 0,1 ml Flüssigkeit keine gleichmäßig großen Quaddeln zu erzielen waren. Auf eine Quaddel kam 0,5 mg Meerschweinchenhirngewebe bzw. 0,025 mg EP.

Nach etwa 4 Std. wurde die Haut auf Sofortreaktionen hin geprüft. Nach ungefähr 24 Std. wurden die Hautreaktionen v. verzögerten Typ abgelesen: Der Durchmesser der Rötung wurde ausgemessen und der Grad der Infiltration durch die Messung der Dicke einer in der infiltrierten Hautpartie aufgehobenen Hautfalte bestimmt. Gleichzeitig wurde auch die Dicke nichtinfiltrierter Haut auf die gleiche Weise gemessen. Zur Auswertung wurde die Differenz der Dicke infiltrierter und nichtinfiltrierter Haut gebildet.

Die Rötung war meist scharf begrenzt und ihr Durchmesser deshalb auf der weißen Haut gut zu ermitteln. Schwieriger war es, die Dicke aufgehobener Hautfalten zu messen; der Meßfehler war hier wohl größer, zumal die Haut schon natürlicherweise nicht an allen Stellen gleich dick ist. In Zweifelsfällen verließen wir uns daher vor allem auf den Durchmesser der Rötung und nahmen die Dicke der Infiltration als zusätzlichen Anhaltspunkt.

Innerhalb einer Gruppe wurde das arithmetische Mittel aus den Einzelwerten gebildet.

C) Ergebnisse

I. Die Wirkung der Asparaginase auf die EAE

Ergebnisse der Untersuchungsgruppen I und II (Kontrollen):

Je eine Kontrollgruppe wurde zu Beginn und am Ende der Untersuchungsserie in beschriebener Weise immunisiert.

Die EAE begann bei beiden Gruppen vom 11. bis zum 15. Tag (durchschnittlicher Erkrankungsbeginn: $12,4 \pm 1$ Tag).

Von den insgesamt 20 Tieren erkrankten 19 klinisch an einer EAE, davon 12 Tiere schwer (als schwer erkrankte Tiere bezeichneten wir solche, die 2 Kreuze oder mehr nach unserem Bewertungsschema erhielten).

Am 20. Tag nach der Immunisierung war der Erkrankungsindex als Maß für die Erkrankungsschwere $2,1 (\pm 1,3)$. Die Symptome der Erkrankung blieben in dieser Stärke ungefähr über die nächsten 10 Tage bestehen, um sich dann im Laufe der nächsten Wochen bei den überlebenden Tieren langsam abzuschwächen.

8 der 20 Tiere erlagen der Erkrankung; sie starben vom 15. bis zum 25. Tag (siehe hierzu auch die Zeichnungen 4 und 5).

Die EAE wurde regelmäßig durch starke Gewichtsstürze eingeleitet, der Gewichtsverlust betrug in ausgeprägten Fällen $1/3$ des Körpergewichts vor der Erkrankung. Einen typischen Gewichtsverlauf bei Krankheitsbeginn zeigt die Abbildung 2.

Die Lähmungen begannen gewöhnlich an den hinteren Extremitäten; sie waren mit einer ausgeprägten Muskelhypotonie verbunden. Ein Befall der vorderen Extremitäten war nicht festzustellen. Zittern, ataktische Gangstörungen, Gleichgewichtsstörungen mit Unfähigkeit, sich aus Rückenlage auf die Füße zu drehen, und tonisch-klonische Krämpfe konnten hinzutreten. Das schwerste Krankheitsbild war die mit Stuhl- und Harninkontinenz verbundene komplette Querschnittslähmung. Wir töteten solche Tiere präfinal mit einer intraperitonealen Injektion von 60 mg Pentobarbital (Nembutal^(R)).

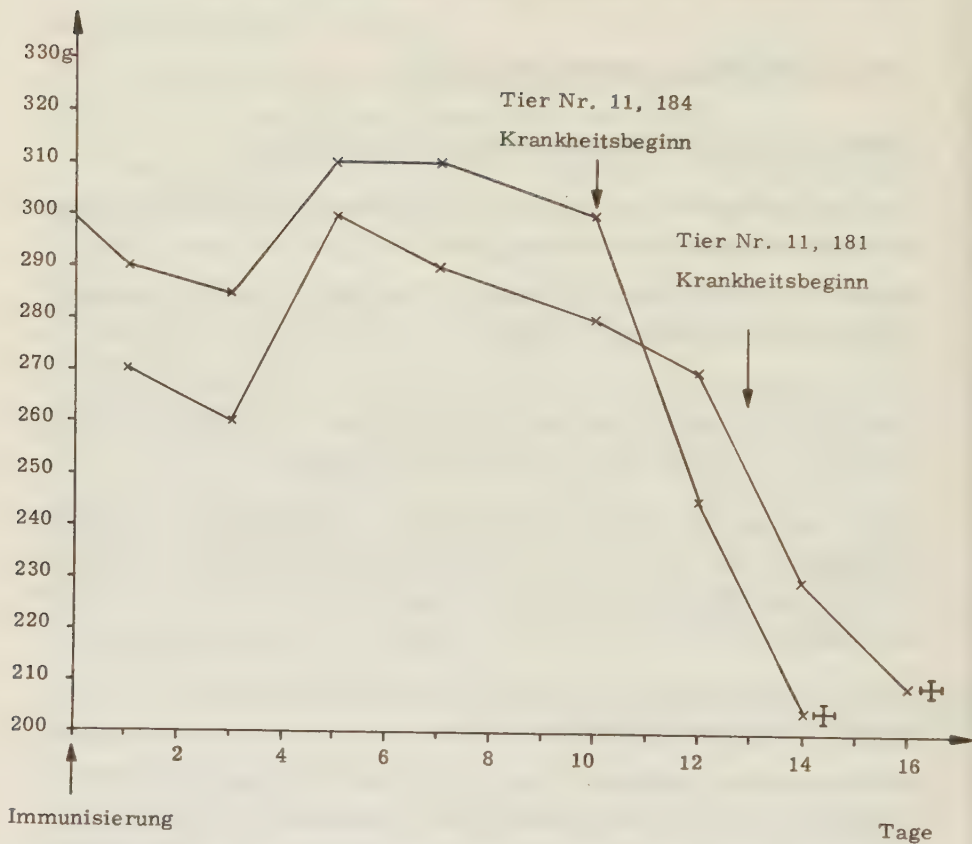


Abb. 2 Typischer Gewichtsverlauf bei 2 Kontrolltieren, die am 11. und am 13. Tag an schnell zum Tode führenden Encephalomyelitiden erkrankten.

Gruppe III. 10 mit 5 000 IU/kg/Tag Asparaginase vom Tag ± 0 bis + 13 behandelte Meerschweinchen.

Die Tiere dieser Behandlungsgruppe erkrankten vom 10. bis zum 15. Tag nach der Immunisierung (durchschnittlicher Erkrankungsbeginn: 12,0.Tag, also etwas früher als die Kontrollen: 12,4. Tag).

Die Gesamtzahl der erkrankten Tiere unterschied sich nicht von derjenigen der Kontrollgruppen (10/10 bzw. 19/20 der Tiere), doch waren im Vergleich zu den Kontrollen die Krankheitsverläufe schwerer und führten in einem hohen Prozentsatz zum Tode. Der Krankheitsindex betrug am 20. Tag 3,2, gegenüber 2,1 bei den Kontrollen.

8 der 10 Tiere erlagen der Erkrankung (siehe die folgenden Zeichnungen).

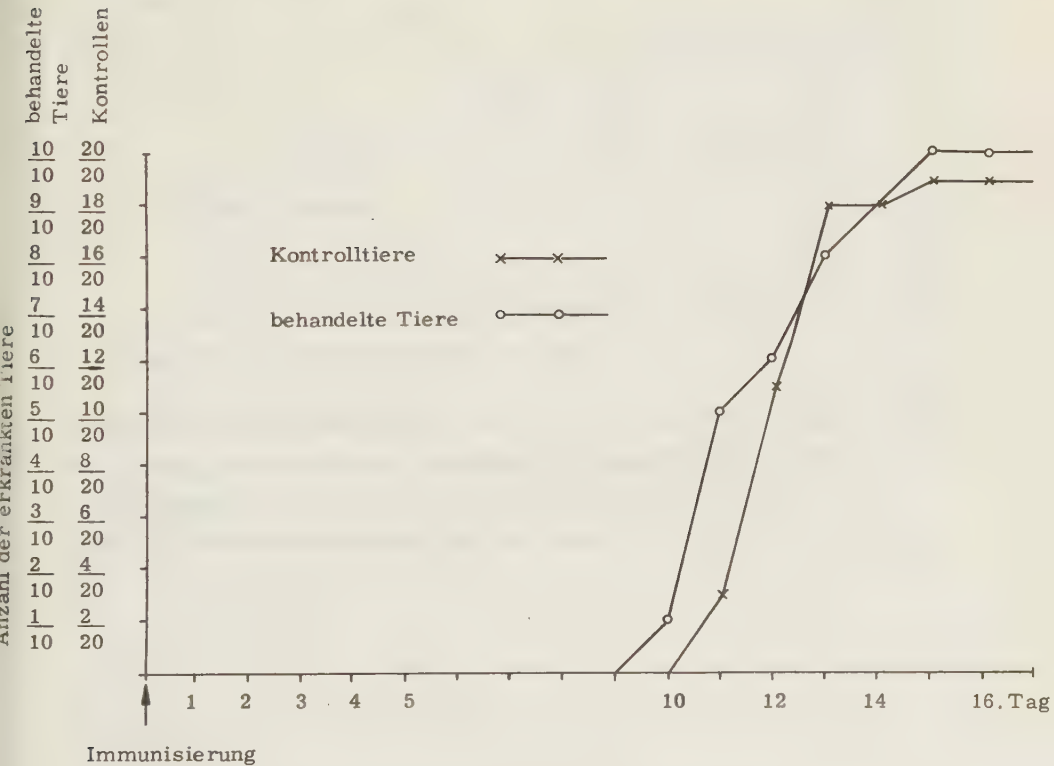


Abb. 3 EAE-Beginn bei 20 Kontroll- und 10 Asparaginase-behandelten Tieren (5 000 IU/kg/Tag). Alle Tiere mit einer EAE-Symptomatik (auch die leichteren Fälle) sind mitaufgeführt.

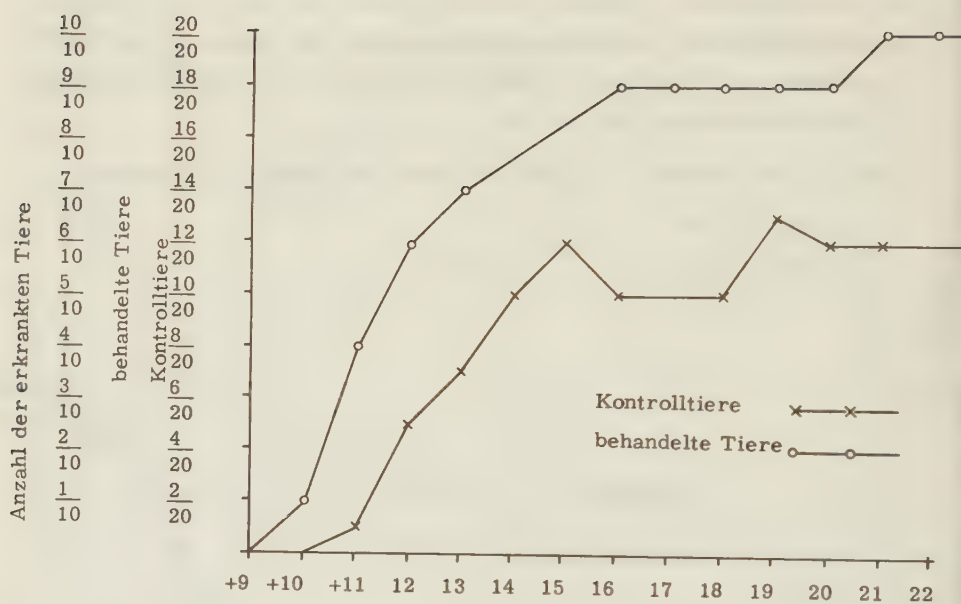


Abb. 4 Schwererkrankte Tiere (Tiere mit 2 Kreuzen oder mehr) bei der mit 5 000 IU/kg/Tag von ± 0 bis + 13 behandelten Untersuchungsgruppe und bei den Kontrollgruppen. Immunisierung am Tag ± 0 . Erkrankungsbeginn bei den behandelten Tieren + 10. Tag, bei den Kontrolltieren + 11. Tag.

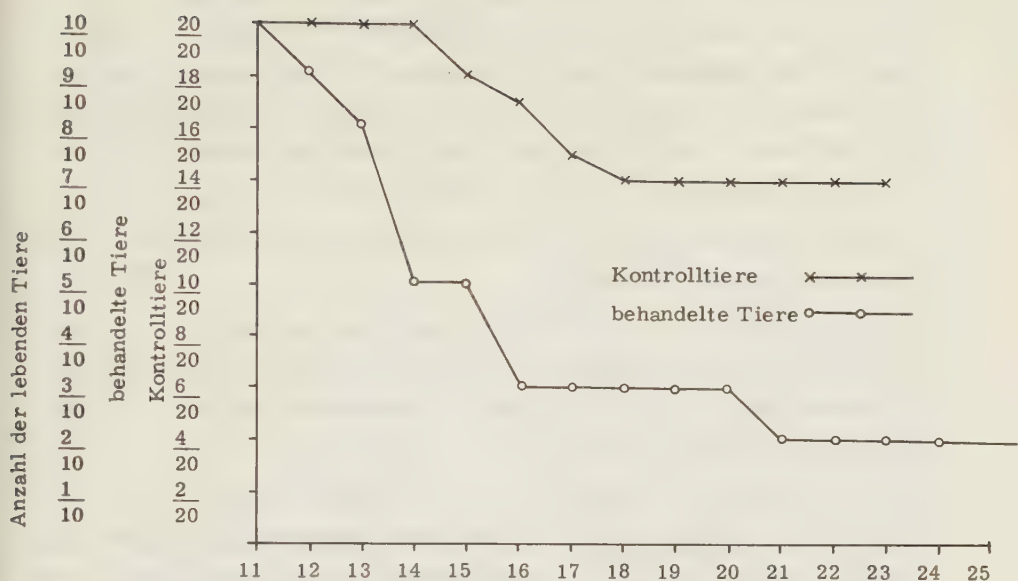


Abb. 5 Absterbekurve für die mit 5 000 IU/kg/Tag von ± 0 bis + 13 behandelte Untersuchungsgruppe und die Kontrollgruppen. Immunisierung am ± 0 Tag.

Die Kurve zeigt die Anzahl der an einem bestimmten Tag jeweils noch am Leben befindlichen Tiere. Bei von uns getöteten, schwerkranken Tieren wurde der nachfolgende Tag als Todestag vermerkt.

Die beiden folgenden Untersuchungsgruppen IV und V wurden mit gleichen Asparaginasedosen über den gleichen Zeitraum behandelt. Trotzdem weichen ihre Ergebnisse stark voneinander ab.

Gruppe IV. 10 mit 10 000 IU/kg/Tag Asparaginase von Tag ± 0 bis + 20 behandelte Meerschweinchen.

Von den 10 Tieren erkrankten bis zum Ende der Asparaginasebehandlung am

20. Tag 5 Tiere an der EAE. Die Krankheit begann bei ihnen vom 12. bis zum 15. Tag (durchschnittlicher Krankheitsbeginn 13,6. Tag). Die Paresen waren jedoch flüchtig und bildeten sich bis zum 20. Tag (Ende der Therapie) bei 3 von den 5 erkrankten Tieren zurück. Auch kam es unter der Behandlung mehrmals zum Rückgang schon aufgetretener schwererer Lähmungen (s. die gesonderte Darstellung der schwer erkrankten Tiere in Abb. 7).

Weitere 5 Tiere blieben bis zum 20. Tag ohne Paresen, erschienen auch sonst gesund und verloren kein Gewicht.

Am 20. Tag waren nur noch bei 2 Tieren Symptome einer EAE nachzuweisen: kein Tier hatte schwerere Lähmungen, kein Tier war gestorben. Der Erkrankungsindex betrug 0,55 am 15. Tag und verringerte sich bis zum 20. Tag auf 0,45 (Kontrollen am 20. Tag 2,1).

Nach dem Absetzen der Asparaginase am 20. Tag kam es vom 22. Tag an zur Exazerbation der EAE. Bis zum 30. Tag waren insgesamt 6 der 10 Tiere erkrankt, davon 4 schwer. 3 Tiere starben am 25., 27. und am 31. Tag, ein weiteres erkrankte am 34. Tag und starb am 37. Tag (siehe die Abb. 8 und 9).

Der Erkrankungsindex betrug am 30. Tag 1,45; die Erkrankungsschwere war somit deutlich geringer als bei den Kontrollgruppen im akuten Stadium der EAE, am 40. Tag (Ende der Beobachtungszeit) war aber die Erkrankungsschwere mit einem Erkrankungsindex von 2,45 ähnlich derjenigen der Kontrollgruppen.

Auch bei dieser hohen Dosierung konnten wir eine unmittelbar toxische Wirkung der Asparaginase nicht feststellen. Die Tiere machten einen gesunden Eindruck und verloren nicht an Gewicht, solange sie nicht an der EAE erkrankten.

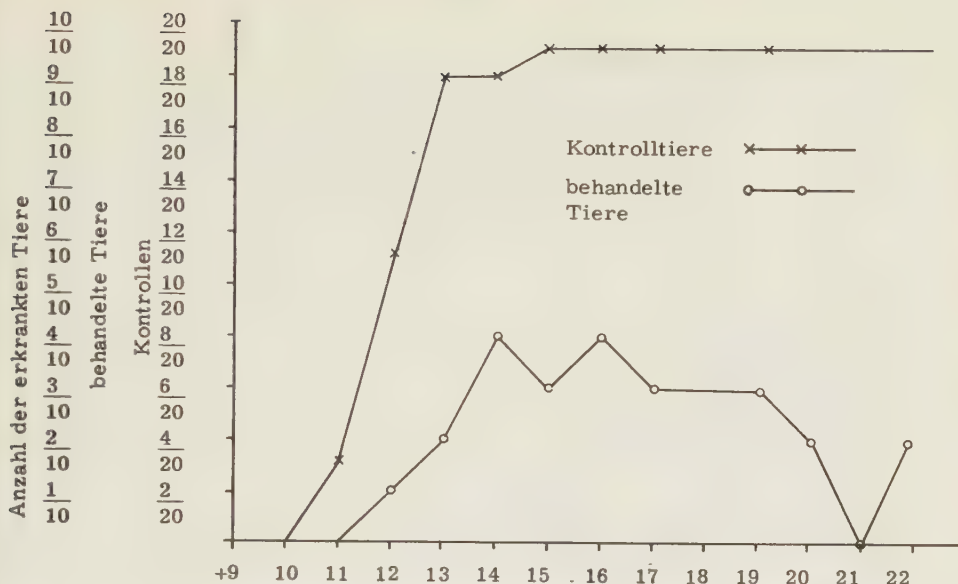


Abb. 6 EAE-Beginn der 10 mit 10 000 IU/kg/Tag Asparaginase von Tag ± 0 bis + 20 behandelten Meerschweinchen (Gruppe IV) im Vergleich zum Krankheitsbeginn der Kontrollgruppen. Immunisierung am Tag ± 0 .
Am 20. Tag nach der Immunisierung wurde die Asparaginase abgesetzt.

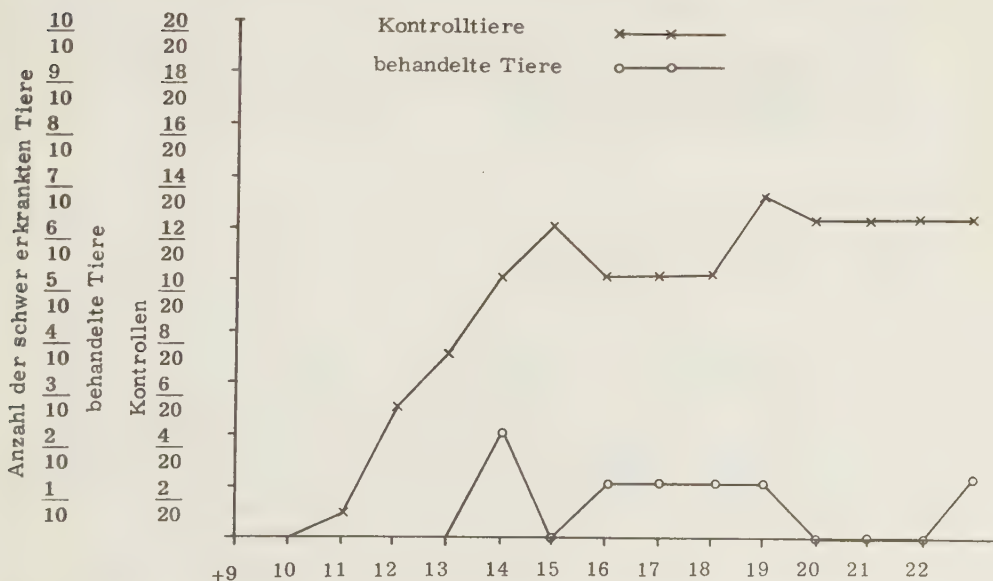


Abb. 7 Schwer erkrankte Tiere der Gruppe IV und der Kontrollgruppen.

Immunisierung am Tag ± 0 .

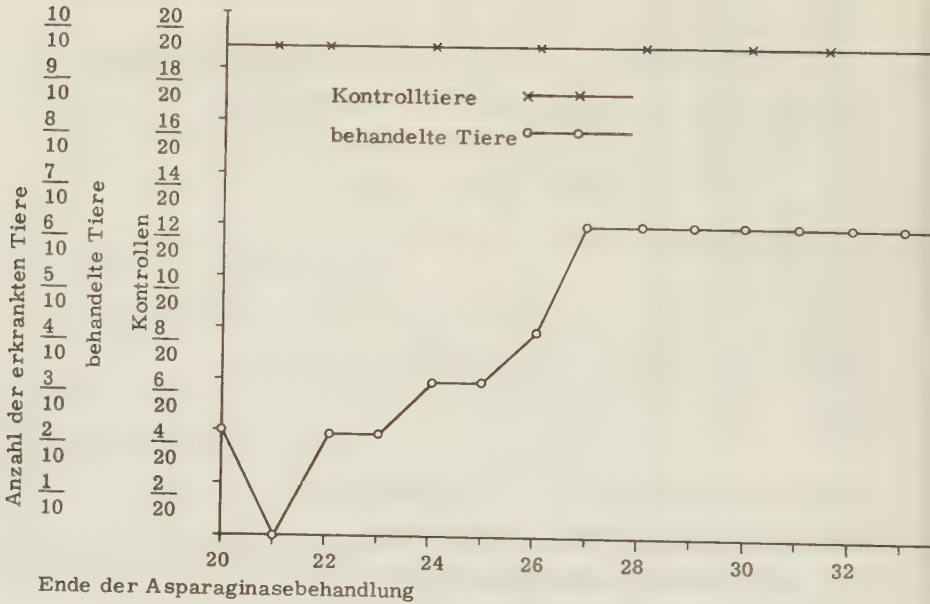


Abb. 8 Exazerbation der EAE nach Absetzen der Asparaginase am 20. Tag. Zunächst kam es am 21. Tag zum völligen Verschwinden aller Symptome (Gruppe IV). Vom 22. Tag an nahm die Zahl der erkrankten Tiere kontinuierlich zu, ohne jedoch die Anzahl der Erkrankungen in den Kontrollgruppen zu erreichen.

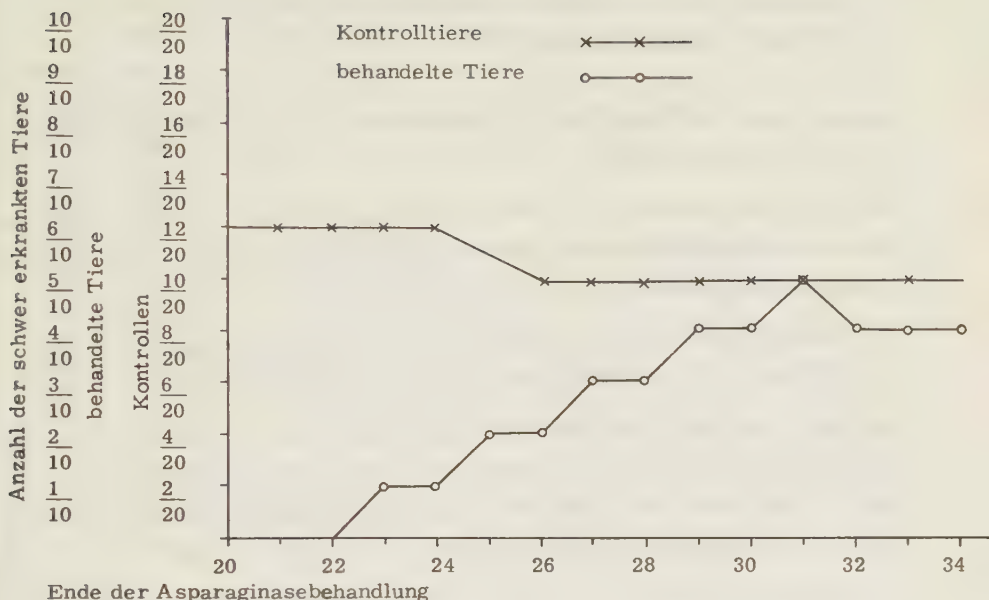


Abb. 9 Auch in dieser Abbildung kommt das Wiederauftreten der EAE nach dem Ende der Therapie zum Ausdruck.
Die Anzahl der schwer erkrankten Tiere der Untersuchungsgruppe IV unterschied sich nach dem 30. Tag nicht mehr von derjenigen der Kontrollgruppen.

Gruppe V. 10 mit 10 000 IU/kg/Tag Asparaginase von Tag ± 0 bis ± 20 behandelte Meerschweinchen. (Dosierung, Beginn und Dauer der Therapie wie bei der vorausgehenden Gruppe IV.)

Der Beginn der Erkrankung war vom 12. bis zum 18. Tag, also mit einem durchschnittlichen Erkrankungsbeginn von 13,5 gegenüber den Kontrollen um 1 Tag verspätet. Die Gesamtzahl der erkrankten Tiere betrug 9/10, die Zahl der schwer erkrankten Tiere am 20. Tag 7; zu diesem Zeitpunkt waren 4 Tiere der Erkrankung erlegen, ein weiteres starb in der folgenden Woche. (Erkrankungsindex am

20. Tag 2,45.) Ein Unterschied zu den Kontrollen bestand also außer dem etwas verzögerten Beginn der EAE nicht.

Gruppe VI. 10 mit 7 000 IU/kg/Tag Asparaginase von Tag -7 bis +20 behandelte Meerschweinchen.

Auch eine Vorbehandlung mit 7 000 IU Asparaginase/kg und Tag, beginnend eine Woche vor der Immunisierung, konnte das Auftreten der allergischen Encephalomyelitis nicht verhindern.

Erkrankungsbeginn war der 11. bis 20. Tag, durchschnittlich der 13,1. Tag. Alle 10 Tiere der Untersuchungsgruppe hatten klinische Zeichen einer EAE.

Die EAE verlief auch hier, ähnlich wie in Gruppe III perakut: Bis zum 20. Tag erkrankten alle 10 Tiere an schweren Lähmungen. 8 Tiere starben vom 14. bis zum 21. Tag, nur 2 Tiere überlebten. Der Erkrankungsindex am 20. Tag betrug 3,35 (Kontrollen: 2,10). (Siehe hierzu auch die Abb. 10 und 11.)

Als Nebentbefund fanden wir bei einem Tier eine Entzündung eines Auges, bei 2 weiteren je einen Abszeß der Bauchwand, vermutlich an den Einstichstellen der Injektionskanülen.

Toxische Wirkungen der Asparaginase fanden wir auch bei dieser langdauernden Behandlung (4 Wochen) nicht.

Gruppe VII. 10 mit 10 000 IU/kg/Tag Asparaginase von Tag -7 bis +20 behandelte Meerschweinchen.

Von den über den gleichen Zeitraum wie die Gruppe VI, nur mit höherer Dosierung behandelten Meerschweinchen erlebten nur 2 den üblichen Ausbruchtermin der EAE, den +11. Tag. Die anderen Tiere starben vom 7. bis 11. Tag nach der Immunisierung an schweren eitrigen Peritonitiden. Bei der Eröffnung der Tiere fanden wir außerdem multiple Abszesse in der Bauchwand und intraperitoneal.

Von den 2 den 11. Tag überlebenden Tieren starb eines am 14. Tag ebenfalls an einer Peritonitis, jedoch ohne klinische Zeichen einer EAE, ein weiteres blieb gesund.

Die Ursache für die gehäuften Infektionen in dieser und der vorhergehenden Untersuchungsgruppe liegt wohl in der Schwächung der Immunabwehr der Meerschweinchen durch die Asparaginase. Die der Immunisierung stets nachfolgenden ulzerierenden Entzündungen an der Stelle der Antigendeponierung schaffen dann die Eintrittspforten für die Erreger, denen die Meerschweinchen in der Folge erliegen.

Möglich ist aber auch, daß virulente Keime von einem erkrankten Tier auf die anderen mit unseren Injektionsnadeln überimpft wurden. Doch bleibt dieser Befund bemerkenswert, weil Meerschweinchen sonst gegen alle Arten von Erregern erstaunlich resistent sind.

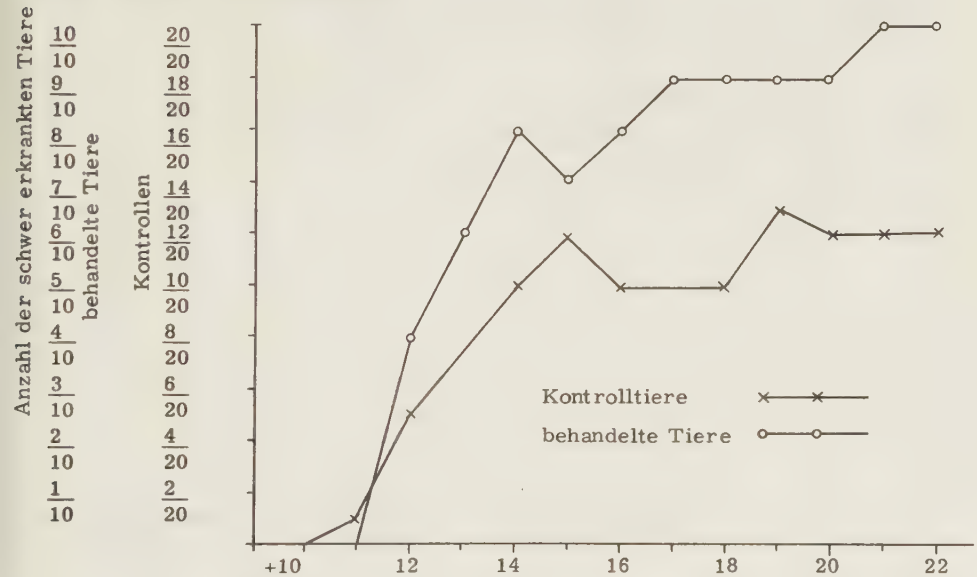


Abb. 10 Schwer erkrankte Tiere der Gruppe VI (7 000 IU/kg/Tag Asparaginase von -7 bis +20) und der Kontrollgruppen.
Immunisierung am Tag ± 0 .

Gruppe VIII. 10 mit 10 000 IU/kg/Tag Asparaginase von Tag +7 bis +20 behandelte Meerschweinchen.

Keine Wirkung zeigte eine Asparaginasebehandlung mit 10 000 IU/kg wenn sie erst eine Woche nach der Immunisierung begonnen wurde. Die Tiere erkrankten vom 11. bis 16. Tag (durchschnittlicher Krankheitsbeginn: Tag 12,9; Kontrollen: 12,4).

Am 20. Tag nach der Immunisierung waren alle 10 Tiere erkrankt, davon 7 schwer; 3 Tiere waren gestorben, ein weiteres starb am 25. Tag. Der Erkrankungsindex war am 20. Tag 2,45.

Die Ergebnisse unterscheiden sich außer dem vielleicht etwas verzögerten Krankheitsbeginn nicht von denjenigen der Kontrollgruppen.

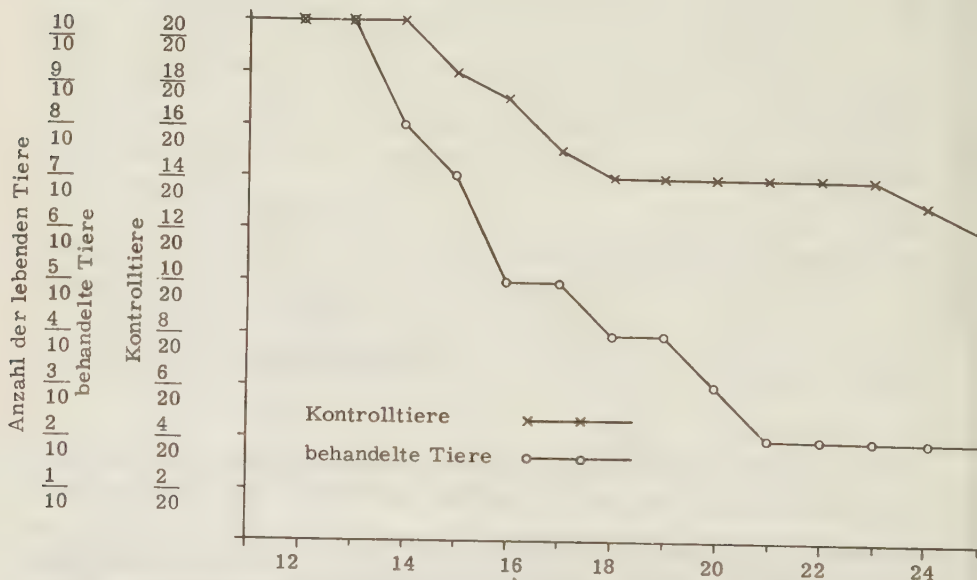


Abb. 11 Absterbekurve der Tiere der Gruppe VI (7 000 IU/kg/Tag von -7 bis +20) und der Kontrolltiere. Immunisierung am Tag ± 0 . Die Kurve beginnt beim Manifestwerden der Erkrankung (+ 11 Tag).

Gruppe IX. 10 nichtimmunisierte Tiere, die 3 Wochen lang Asparaginase in einer Dosierung von 8 000 IU/kg/Tag erhielten (negative Kontrollen).

Dieser Versuch wurde unternommen, um eine direkt toxische Wirkung hoher Asparaginasedosen auf das Meerschweinchen auszuschließen, und um eventuell auftretende anaphylaktische Reaktionen nach mehrmaliger Asparaginaseanwendung zu erkennen.

Die Verträglichkeit der Asparaginase war jedoch gut. Allgemeinbefinden und Appetit der Tiere waren ungestört. Den Gewichtsverlauf der behandelten Tiere im Vergleich zu demjenigen 2 unbehandelter Tiere zeigt die Abb. 12. Bei beiden Tiergruppen ist ein ziemlich gleichmäßiges Ansteigen der Gewichte ersichtlich. Die durchschnittliche Gewichtszunahme im 3wöchigen Behandlungszeitraum betrug 62 g bei den behandelten Tieren, bzw. 75 g bei den beiden Kontrolltieren.

Symptome des anaphylaktischen Schocks (Ateminsuffizienz, Absinken der Körpertemperatur, Juckreiz, Somnolenz etc.) konnten wir nicht feststellen. 1 Tier starb am 17. Tag des Behandlungszeitraums; die Todesursache konnten wir nicht klären.

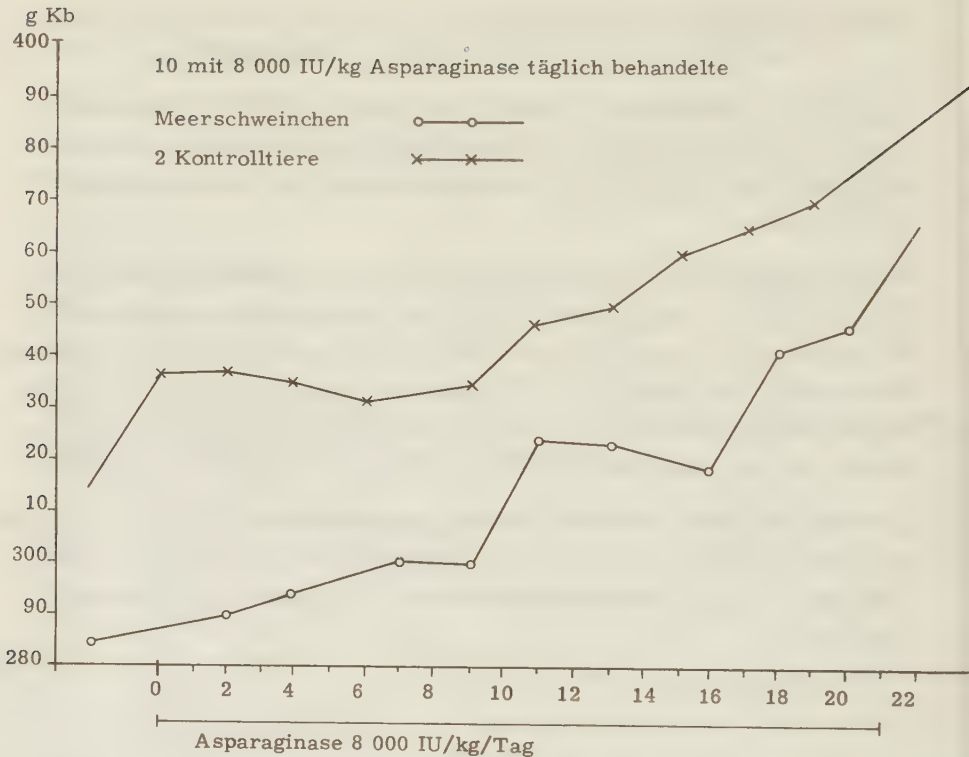


Abb. 12 Gruppe IX. Gewichtsverlauf bei 10 mit 8 000 IU/kg Asparaginase pro Tag behandelten Meerschweinchen und 2 Kontrolltieren.

Eine Übersicht über den EAE-Verlauf bei allen immunisierten Tieren, bzw. über die Wirkung der Asparaginase-Behandlung gibt die folgende Tabelle 2.

Gruppe Anzahl tägl. Aspa- der rag. Dosis Zeitraum durch- schnittl. Erkrän- kungsbe- ginn

Tiere IU pro kg handlung

I u. II	20	unbehan- delt	12,4	19	12	6	2,1	2
III	10	5000	± 0 bis +13	10	9	7	3,2	1
IV	10	10000	± 0 bis +20	2	0	0	0,45	2
V	10	10000	± 0 bis +20	9	7	4	2,45	1
VI	10	7000	-7 bis +20	10	9	7	3,35	1
VII	10	10000	-7 bis +20	nicht auswertbar, nur noch 1 Tier am Leben				
VIII	10	10000	+7 bis +20	10	7	3	2,45	1

Tabelle 2 Übersicht über die Krankheitsverläufe der 2 Kontrollgruppen und der 6 Asparaginase-behandelten Untersuchungsgruppen. Als Stichtag für die Aufstellung der Wertetabelle hat sich der 20. Tag als der günstigste erwiesen. Nach diesem Tag erkrankten nur noch sehr selten einzelne Tiere (ausge- nommen Gruppe IV), die Symptomatik der EAE war bei den erkrankten Tieren zumeist voll ausge- bildet, so daß eine gute Übersicht über Ausmaß und Stärke der EAE zu erreichen ist.

Die Asparaginase-behandelten Untersuchungsgruppen lassen sich nach der Erkrankungsschwere ordnen. Es ergibt sich dann folgendes Bild:

1) Die Untersuchungsgruppe VIII unterscheidet sich in den gemessenen Parametern nicht oder nur gering von den Kontrollgruppen. Eine Wirkung der Asparaginase-Behandlung ist also hier nicht sichtbar.

2) Bei der Gruppe IV konnte die EAE bei der Mehrzahl der Tiere in ihrem Ausbrechen verhindert werden, erkrankte Tiere hatten nur leichte Symptome. Nach Absetzen der Therapie kam es jedoch zur Exazerbation der Erkrankung, ein bleibender Therapieerfolg konnte nicht erzielt werden.

Ein Teilerfolg wurde bei der Untersuchungsgruppe V durch Hinausschieben des Erkrankungsbeginns um 1 Tag erzielt; Erkrankungshäufigkeit und -schwere waren jedoch gegenüber den Kontrollgruppen unverändert.

3) Eine besonders schwere, hyperakute Verlaufsform der EAE sahen wir hingegen bei den Untersuchungsgruppen III und VI.

Die Tiere erkrankten an schweren Lähmungen und starben gewöhnlich kurze Zeit nach Beginn der Erkrankung.

Nebenwirkungen der Asparaginasetherapie:

Nach unseren Untersuchungen ist die Asparaginase auch in sehr hohen Dosen für das Meerschweinchen gut verträglich.

Es kam bei unseren Tieren nicht zu den von anderen Untersuchern mitgeteilten Gewichtsverlusten (109) (siehe bes. Gruppe IX). Die vermehrte Infektanfälligkeit nach Behandlung mit großen Asparaginasedosen ist wohl als Therapieeffekt zu werten.

II. Ergebnisse des Hauttests

Der Hauttest wurde wie unter B) 5. beschrieben am 9. oder 10. Tag nach der Immunisierung mit zwei gleichzeitigen Injektionen von Meerschweinchenhirngewebe und encephalitogenem Protein vom Rind durchgeführt.

Die Prüfung der gequaddelten Hautstellen 4 Stunden nach der Einspritzung der beiden Antigene ergab außer einer blassen Rötung der Injektionsstellen keine weiteren Reaktionen.

Nach 24 Stunden war bei der Mehrzahl der Tiere die Haut an den Injektionsstellen gerötet und infiltriert. Die Reaktion gegen das bovine encephalitogene Protein (EP) war bei den meisten Tieren deutlich stärker als diejenige gegen Meer-schweinchenhirngewebe. Beide Reaktionen korrelierten in ihrer Stärke, d. h., bei starker Reaktion gegen das EP war auch die Reaktion gegen das Hirngewebe kräftig, und umgekehrt.

Folgende Untersuchungsgruppen mußten bei der Auswertung unberücksichtigt bleiben:

Gruppe VII. Hier waren zum Zeitpunkt der Hauttestung nur noch 4 Tiere am Leben. 2 weitere Tiere starben vor dem 11. Tag.

Gruppe II und Gruppe V. Bei diesen beiden Gruppen konnten wir aus äußeren Gründen die Tiere erst am 12. Tag mit Quaddeln versehen. Zum Zeitpunkt der Ablesung, am 13. Tag waren bereits 7 von den 10 Tieren der Gruppe II und 5 der 10 Tiere der Gruppe V an der EAE erkrankt. Die Hautreaktion ist nach der Literatur bei an der EAE erkrankten Tieren abgeschwächt oder aufgehoben (162).

So fanden wir auch eine abgeschwächte Hautreaktion bei den erkrankten Tieren der Gruppe V, jedoch keine sichere Verminderung der Hautreaktion bei den erkrankten Tieren der Gruppe II.

Für die verbliebenen Gruppen I, III, IV, VI und VIII ergaben sich folgende Werte:

Reaktion gegen:	Meerschweinchenhirngewebe		Encephalitogenes Protein vom Rind	
Untersuchungsgruppe	Durchmesser der Rötung (mm)	Dicke der Infiltration (mm)	Durchmesser der Rötung (mm)	Dicke der Infiltration (mm)
I (Kontrollen)	4,89	0,43	5,77	0,42
III	5,79	0,58	8,69	0,76
IV	4,16	0,40	4,83	0,33
VI	3,45	0,10	4,04	0,17
VIII	3,30	0,09	5,10	0,16

Tabelle 3 Die angegebenen Werte stellen die arithmetischen Mittelwerte aller innerhalb einer Gruppe erhaltenen Einzelwerte dar.

Vergleicht man die Werte der Tabelle 3 mit dem Verlauf der EAE bei den verschiedenen Untersuchungsgruppen, so ergibt sich:

1. Einer verstärkten Hautreaktion bei Gruppe III entspricht eine akut verlaufende EAE.
2. Bei Gruppe IV ist die Hautreaktion trotz eines milden EAE-Verlaufs nicht wesentlich gegenüber den Kontrollen abgeschwächt.
3. Gruppe VI, deren Erkrankung einen ähnlich hyperakuten Verlauf nahm wie bei Gruppe III, zeigt im Vergleich zu dieser und den Kontrollen abgeschwächte Hautreaktionen.
4. Ebenso waren bei Gruppe VIII, mit einem gegenüber den Kontrollen nicht veränderten Krankheitsverlauf die Hautreaktionen stark abgeschwächt.

Die Stärke der Hautreaktionen gegen EP vom Rind und homologes Gehirn steht also bei unseren Versuchen in keiner Relation zum Krankheitsverlauf, wenn man die mittlere Stärke der Hautreaktionen der Untersuchungsgruppen (arithmetische Mittelwerte) als Bezugsgrößen nimmt.

Aber auch für die Einzeltiere innerhalb einer Untersuchungsgruppe läßt sich eine solche Relation nicht nachweisen:

1. So ließ sich nach dem Ausfall des Hauttests für das Einzeltier nicht vorher-sagen, ob es an einer EAE erkranken würde oder nicht, noch ließ sich etwas über die Stärke einer eventuellen Erkrankung aussagen.

Teilt man eine Untersuchungsgruppe in Tiere mit starker und solche mit schwacher Hautreaktion auf, so ergeben sich keine verwertbaren Unterschiede hinsichtlich der Erkrankungshäufigkeit und -schwere zwischen den gebildeten Untergruppen.

2. In jeder Gruppe waren Tiere, die außer einer minimalen Reaktion an der Injektionsstelle überhaupt keine Hautveränderungen hatten oder nur eine diffuse, nicht begrenzte Rötung der Haut zeigten. Auch diese Tiere erkrankten, soweit sich das wegen ihrer geringen Anzahl feststellen ließ, in nicht geringerem Prozentsatz als die anderen Tiere.

Die Annahme, daß es sich bei diesen Tieren um solche handele, deren Hauttest durch eine im Ausbrechen befindliche EAE negativ geworden war, konnten wir nicht erhärten: Tiere mit negativem Hauttest erkrankten nicht früher an der EAE als solche mit positivem.

3. Meerschweinchen, die bis zum 26. Tag ihrer Erkrankung erlegen waren, also schwer an der EAE erkrankt waren, hatten keine verstärkten Hautreaktionen gegenüber Tieren, die zu diesem Zeitpunkt noch lebten.

Dagegen läßt sich doch eine zumindest teilweise Korrelation zwischen der Stärke der Hautreaktion und der Asparaginasebehandlung feststellen.

Die Hautreaktionen der 4 Asparaginase-behandelten Untersuchungsgruppen waren gegenüber denjenigen der Kontrollen mit der einen Ausnahme der Gruppe III mehr oder weniger stark vermindert.

Eine vollkommene Unterdrückung der Hautreaktionen war bei keiner der behandelten Untersuchungsgruppen durch die Asparaginase zu erreichen.

Gruppe III. 5 000 IU Asparaginase/kg/Tag vom Zeitpunkt der Immunisierung an gegeben, konnten die Hautreaktionen nicht unterdrücken; diese waren vielmehr verstärkt.

Gruppe IV. Eine Behandlung mit 10 000 IU vom Tag der Immunisierung an hingegen konnte ihre Stärke beträchtlich reduzieren.

Gruppe VI. Eine noch stärkere Verminderung wurde durch die Asparaginase-Behandlung mit 7 000 IU/kg/Tag 1 Woche vor der Immunisierung beginnend erzielt. Vor allem die Infiltration ging stark zurück.

Gruppe VIII. Eine Behandlung mit 10 000 IU/kg/Tag, die 7 Tage nach der Immunisierung begann, verringerte die Hautreaktionen ebenso stark wie die Vorbehandlung mit 7 000 IU und stärker als die Zugleichbehandlung mit 10 000 IU (s. Tabelle 3).

Wir haben für diesen letzteren Befund keine Erklärung, wenn wir nicht annehmen, daß hierfür Fehler der Methodik (unterschiedliche Antigene o. ä.) verantwortlich sind.

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß wir einen Zusammenhang zwischen dem Ausfall der Hauttestung und dem Verlauf der EAE weder bei den Asparaginase-behandelten noch bei den unbehandelten Meerschweinchen feststellen konnten. (Die möglichen Gründe hierfür werden in der Diskussion erörtert.)

Die Asparaginasebehandlung in Tagesdosen von mehr als 5 000 IU/kg verringert die Hautreaktionen in unterschiedlichem Ausmaß.

D) Diskussion

Wie in der Einleitung ausgeführt, sind nicht nur einige maligne Zellstämme Asparaginase-sensibel, sondern auch normale Körpergewebe. Voraussetzung ist die hohe Stoffwechselaktivität der Zellen.

So ist die Mitoserate der Rattenleber nach 2/3-Teilhepatektomie unter der Asparaginase-Therapie signifikant vermindert (16, 67). Die nach Teilresektionen der Leber auftretende Verfettung und Schwellung der verbliebenen Leberzellen wird durch die Asparaginase beträchtlich gesteigert (16, 67).

Adamson und Fabro beschrieben beim schwangeren Kaninchen Mißbildungen der Feten und intrauterinen Fruchttod nach Asparaginase-Behandlung (1).

Beim Menschen gehören pathologische Leberfunktionsproben zu den üblichen Nebenwirkungen der Asparaginase-Therapie (70, 119, 145). Ferner kommt es beim Menschen und auch beim Affen zur Verfettung der Leberzellen (72).

Weitere Stoffwechselstörungen sind die Abnahme des Gesamteiweißes im menschlichen Serum und eine Verringerung von Gerinnungsfaktoren (70, 95, 156).

Entsprechend der bevorzugten Wirksamkeit der Asparaginase auf Neoplasien lymphatischen Ursprungs werden auch normale lymphatische Gewebe beeinträchtigt.

Bei Asparaginase-behandelten Mäusen ist das Milzgewicht deutlich reduziert und der Zellgehalt vermindert (38, 150, 169), entsprechend ist in der Milz von allen normalen Körpergeweben die C^{14} -Asparagin-Einbauhemmung am stärksten (65). Der Gehalt an freiem Asparagin nimmt besonders in der Milz und im Thymus sehr stark ab (31).

Nach mehrtägiger Inkubation mit Asparaginase in vitro sind nicht nur leukämische, sondern auch ein großer Teil normaler menschlicher Lymphozyten abgetötet (146).

Nach diesen Befunden liegt die Erwartung einer guten immunsuppressiven Wirksamkeit der Asparaginase nahe. In zahlreichen Untersuchungen hat sich diese Erwartung bestätigen lassen. Die wichtigsten sind folgende:

1. In-vitro-Versuche

Verhinderung der Blastogenese in mit verschiedenen Mitogenen (Phythämagglutinin u. a.) stimulierten Lymphozytenkulturen vom Menschen und vom Hund (10, 11, 12, 13, 34, 41, *85, 120, 168, 169).

Verhinderung der PPD-induzierten Transformation von Lymphozyten aus mit Freund'schem Volladjuvans immunisierten Meerschweinchen (144). Verminderung der Blastenbildung in der gemischten Lymphozytenkultur von Mensch und Hund (111).

2. In-vivo-Versuche

A) Humorale Immunität

Hemmung der Hämagglutinin-Bildung bei Mäusen nach Immunisierung mit artfremden Erythrozyten (111, 135, 169).

Verminderung der Hämolyse-bildenden Zellen (nachgewiesen mit der Jerne-Technik) bei der Maus nach Gabe artfremder Erythrozyten (17, 38, 110, 111, 117).

Verminderte Antikörperbildung gegen Rinderalbumin beim Kaninchen (8).

B) Zwischen den beiden Immunsystemen stehend

Verhinderung des Immuno-Cyto-Ahärenz-Phänomens bei der Maus (111).

C) Zelluläre Immunität

Verlängerte Toleranz allogener und xenogener Hauttransplantate bei Ratte und Maus (20, 111, 117, 169).

Hemmung der Tuberkulinreaktion der Haut beim Meerschweinchen (109).

Hemmung der graft-versus-host-Reaktion bei Ratte und Maus (74, 94, 169).

Förderung des Wachstums transplanteder Mäuseleukämien in histoinkompatiblen Wirten (147, 148).

Hemmung der Adjuvans-induzierten Polyarthrititis der Ratte (111).

Unterdrückung der EAE bei der Ratte (9).

3. Klinische Ergebnisse

Bei einigen Fällen menschlicher Erkrankungen, die man als Autoimmunerkrankungen anspricht, konnten mit der Asparaginase Erfolge erzielt werden: Dermatomyositis (58), membranöse Glomerulonephritis, und Goodpasture-Syndrom.

Die Asparaginase scheint nach diesen Befunden stärker auf die zellgebundene Immunität als auf die humorale Immunität zu wirken.

Auch unsere Versuche am Meerschweinchen sprechen für die immunsuppressive Wirkung der Asparaginase.

1. Meerschweinchen, die 3 Wochen lang mit Asparaginase in einer Dosis von 8 000 IU/kg täglich behandelt wurden (Gruppe IX), zeigten keine Symptome einer Überempfindlichkeitsreaktion.

Die Asparaginase ist als hochmolekulares Protein ein starkes Antigen und kann nach parenteraler Verabreichung die Bildung von Antikörpern auslösen.

Werden Meerschweinchen in 2 Einzeldosen Asparaginase injiziert, so kann durch eine weitere Asparaginase-Dosis in 2wöchigem Abstand ein anaphylaktischer Schock ausgelöst werden (108).

Beim Kaninchen werden bei täglicher Asparaginase-Behandlung nur nach Verwendung niedriger Dosen Antikörper gegen Asparaginase nachweisbar; hohe Dosen unterdrücken die Antikörperbildung (8).

Auch beim Menschen kommt es vor allem nach der Behandlung mit niedrigen Asparaginase-Dosen zur Antikörperbildung (8).

Das Fehlen jeglicher allergischer Reaktionen bei unseren Versuchen kann demnach als Ausdruck einer durch die Asparaginase erzielten Immunsuppression gedeutet werden. Doch sind auch andere Erklärungsmöglichkeiten wie z. B. die Erzeugung einer Immunparalyse durch die großen Antigenmengen denkbar.

2. Die Meerschweinchen der Gruppe VII, die mit 10 000 IU:Asparaginase/kg/Tag behandelt wurden, erkrankten zum größten Teil an multiplen Bauchwandabszessen und eitrigen Peritonitiden, denen die Tiere schnell erlagen.

Auch 2 Tiere der Gruppe VI, die täglich 7 000 IU/kg erhielten, hatten Abszesse der Bauchwand. Derartige schwere Entzündungsvorgänge beim Meerschweinchen, das sonst gegen Erreger aller Art sehr resistent ist, können nur erklärt werden, wenn man annimmt, daß die immunologische Abwehr geschwächt wurde.

Bei beiden Untersuchungsgruppen wurde mit der Asparaginase-Behandlung vor der Immunisierung begonnen. Um das Immunisierungsmaterial kommt es zu lokalen Entzündungen, die nach einigen Tagen ulzerieren. Diese Ulzerationen bilden die Eintrittspforten für Erreger, die sich im Tier, dessen Abwehr gelähmt ist, ungehindert ausbreiten.

Für diese These spricht auch, daß es bei keinem Tier, dessen Behandlung wir erst nach der Immunisierung begannen, zu derartigen Allgemeininfektionen kam.

3. Der EAE-Verlauf bei den Asparaginase-behandelten Meerschweinchen der Untersuchungsgruppe IV ist anderen in der Literatur beschriebenen EAE-Verläufen unter immunsuppressiver Therapie sehr ähnlich. Der verspätete Beginn, die Verringerung der Zahl der Erkrankungen, und die Milderung der Erkrankungsschwere sind der typische Ausdruck einer erfolgreichen Behandlung der EAE.

Unter der Annahme einer allergischen Genese der EAE ist die Erklärung der Asparaginase-Wirkung als Erzielung einer Immunsuppression am naheliegendsten.

Die mit der Asparaginase auf die Meerschweinchen-EAE erzielbare Schutzwirkung war jedoch im Vergleich zu derjenigen anderer Medikamente unbefriedigend.

Eine völlige Verhinderung der EAE konnte bei keiner Untersuchungsgruppe erzielt werden.

Demgegenüber konnten A. Khan und Mitarb. (9) schon mit bedeutend geringeren Asparaginase-Dosen als wir sie bei unseren Versuchen anwandten (nämlich 2 500 IU/kg/Tag vom Tag der Immunisierung an bis zum 28. Tag), bei der Lewis-

Ratte eine vollkommene Unterdrückung (klinisch und histologisch geprüft) der EAE erreichen. Die Ratten blieben auch nach Absetzen der Asparaginase während einer 6wöchigen Nachbeobachtungszeit symptomfrei. Als Erklärung hierfür wäre an die Induktion einer echten immunologischen Toleranz gegen die encephalitogene Substanz zu denken.

Bei der Ratte gehört also die Asparaginase zu den am stärksten gegen die EAE wirkenden Medikamenten. Beim Meerschweinchen ist ihre Wirkung dagegen vergleichsweise schwach.

Die Ursache für die geringere Wirksamkeit der Asparaginase beim Meerschweinchen ist wohl im Asparaginasegehalt des Meerschweinchen-Serums zu suchen.

Meerschweinchen und einige andere Nagerarten haben ein natürliches Vorkommen von im Blut zirkulierender Asparaginase (134, 160). Der Asparagin-Spiegel des Serums ist deshalb auf 1/10 des bei vergleichbaren Nagern ohne serumeigene Asparaginase gefundenen Wertes erniedrigt.

Die Wirkung der serumeigenen Asparaginase auf die Zellen des Meerschweinchenorganismus ist derjenigen einer langdauernden Asparaginase-Therapie durchaus vergleichbar (134).

Der Asparaginbedarf der Zellen wird zum großen Teil durch die zelleigene Synthese gedeckt. Man findet daher in Meerschweinchen-Gewebe einen erhöhten Gehalt des Asparagin-synthetisierenden Enzyms, der Asparaginsynthetase (75, 134). Eine hohe Aktivität dieses Enzyms wird vor allem auch in der Milz und im Lymphknoten gemessen (75, 134). Hiernach hätte das immunologische System des Meerschweinchen eine natürliche Resistenz gegen eine Asparaginase-Behandlung und ein Behandlungserfolg bei der EAE wäre somit auch gar nicht zu erwarten. Daß wir dennoch Teilerfolge bei der Behandlung der Meerschweinchen-EAE erzielen konnten, kann folgende Ursachen haben:

1. Die unter unserer Therapie erreichten Asparaginase-Aktivitäten im Serum übertreffen die natürliche Asparaginase-Aktivität des Meerschweinchen-Serums (ungefähr 2 IU/ml Serum im erwachsenen Tier) bei weitem. (Direkte Messungen

beim Meerschweinchen liegen allerdings nicht vor.)

Es kommt dadurch zur völligen Zerstörung des restlichen Serum-Asparagins. Ferner ist ein Wirken der exogen zugeführten Asparaginase auch im Interzellularraum von Geweben anzunehmen. Ein Teil des in der Zelle gebildeten Asparagins wird in den interzellulären Raum abgegeben und kann dort von der Asparaginase abgebaut werden (136).

Nach dieser Vorstellung ist die durch die Asparaginase bewirkte extreme Verarmung an Asparagin auch beim Meerschweinchen die Ursache für ihre Wirksamkeit.

2. Asparaginase-Präparate aus *Escherichia coli* haben eine Glutaminase-Aktivität von bis zu 3 % der Asparaginase-Aktivität (8). In-vitro-Versuche an PHA-stimulierten Lymphozytenkulturen zeigen eine teilweise Aufhebung der Asparaginasewirkung durch Zusatz von Glutamin. Asparagin erweist sich jedoch in dieser Hinsicht gewöhnlich als wirkungsvoller (38, 41, 114, 118, 168).

Eine Klärung dieser Frage ist solange nicht möglich, als keine reinen Glutaminase-Präparate zur Verfügung stehen.

3. Ein Eindringen der Asparaginase in den Intrazellularraum wird von Oerkermann und Hirschmann (118) erörtert. Die Autoren schlossen dies aus der Tatsache, daß Hela-Zellkulturen, die gegen relativ hohe Asparaginase-Dosen unempfindlich geworden waren, bei einer weiteren Dosiserhöhung wieder empfindlich wurden.

4. Eine durch neuere Befunde gestützte Annahme ist, daß die Asparaginase über den Mechanismus des sog. Wettstreits der Antigene (antigenic competition) wirken könnte.

Hammer, Brendel und Mitarb. (69) fanden bei Sprague-Dawley-Ratten eine Verlängerung der Überlebenszeit allogener Hauttransplantate nach Asparaginasebehandlung. Eine Verlängerung der Überlebenszeit konnte mit der Asparaginase jedoch nicht erzielt werden, wenn vorher gegen diese mit Gaben von Brom-cyangespalteter Asparaginase eine Toleranz erzeugt worden war.

Wie vorstehend beschrieben, konnten wir den EAE-Verlauf bei 2 Untersuchungsgruppen günstig beeinflussen. Bei 2 anderen Untersuchungsgruppen jedoch verlief die EAE unter der Asparaginase-Therapie perakut.

Die Frage ist, ob der erschwerte Krankheitsverlauf eine Wirkung der Asparaginasebehandlung sein kann, und welche Mechanismen dafür verantwortlich sein könnten.

Aus der Literatur sind verschiedene Maßnahmen bekannt, die auf den Ausprägungsgrad einer EAE modifizierend einwirken können und eventuell eine Erschwerung des EAE-Verlaufs herbeiführen können.

Die Stärke der EAE ist abhängig von:

1. Der Art und der Menge des zur Sensibilisierung verwendeten Antigens (84).
2. Dem verwendeten Adjuvans und der Antigen-Adjuvans-Relation; bei Verwendung des kompletten Freund'schen Adjuvans auch von der Menge der zugefügten Tuberkelbazillen (96, 152).

Insbesondere läßt sich mit Pertussis-Vaccine in wässriger Lösung oder in inkomplettem Adjuvans eine hyperakute Verlaufsform der EAE erzielen (104, 106).

3. Durch zerebrale Traumatisierung (Cyanidencephalopathie, thermische oder mechanische Noxen) kann die EAE ebenfalls verstärkt werden. Die Umgebung der traumatisierten Areale ist histologisch besonders schwer befallen (22, 97, 171).

4. Durch eine Entfernung der Nebennierenrinden vor der Sensibilisierung kann eine Steigerung der Erkrankungshäufigkeit und -schwere erzielt werden. Dieser Befund spricht für die Bedeutung der endogenen Corticosteroidproduktion beim Ablauf der EAE (107).

Keine der aufgezählten Maßnahmen kann zur Erklärung einer durch die Asparaginase erreichten Verstärkung der EAE herangezogen werden. Dagegen muß gefragt werden, ob die Asparaginase im vorliegenden Fall nicht über einen immunologischen Mechanismus wirken könnte.

In der Literatur sind Berichte über einen verstärkten Krankheitsverlauf unter immunsuppressiver Therapie wie unter der Behandlung mit Antimetaboliten und nach Röntgen-Ganzkörperbestrahlung zu finden. Die meisten Ergebnisse dieser Art entstammen Versuchen mit Meerschweinchen (siehe die folgende Tabelle 4).

Versuchstiere	Behandlung mit	Dosierung, Dauer der Therapie	Inkubationszeit	Intensität der Erkrankung	beschreibende Autoren
Meerschwein.	Prednisolon	2 mg, an -1 u. $\pm$ 0	verkürzt	besonders schwere und perakut zum Tode führende Erkrankung	Ross, Colmant, Böhm 1958 (141)
Meerschwein.	Prednisolon	0,5; 2 oder 10 mg/kg von -4 bis +25 oder von +1 bis +35	verkürzt	unverändert	Allegranza, 1959 (2)
Meerschwein.	6-Mercaptopurin	5 mg/kg von $\pm$ 0 an	verkürzt	verstärkt (histologisch und klinisch)	Field, Miller 1961 (55)
Meerschwein.	6-Mercaptopurin	6 mg/kg von $\pm$ 0 an	etwas verkürzt	unverändert	Field, 1961 (53)
Meerschwein.	6-Mercaptopurin	6 mg/kg von $\pm$ 0 bis +28	etwas verkürzt	Urininkontinenz u. rapider Gewichtsverlust 3mal häufiger als bei d. Kontrollen	Thomson, Austin 1962 (158)
Meerschwein.	Azathioprin	10 o. 30 mg/kg von $\pm$ 0 an	etwas verkürzt	unverändert	Field, 1967 (54)
Meerschwein.	Rö-Bestrahlung	160, 190, 230 oder 270 R mit der Immunisierung	verkürzt	etwas verstärkt	Allegranza, 1959 (2)
Meerschwein.	Rö-Bestrahlung	150 R, 18 Std. vor d. Immunisierung		stark verstärkt	Field, 1961 (52)
Ratten	Rö-Bestrahlung	600 R mit der Immunisierung		eine EAE trat nur bei den behandelten Tieren auf	Allegretti, Matósi 1961 (3)

Tabelle 4: Befunde aus der Literatur über einen verstärkten EAE-Verlauf nach immunsuppressiver Behandlung.

Anmerkungen zu Tabelle 4:

(Die Liste dürfte insofern unvollständig sein, als derartige Befunde wohl seltener veröffentlicht werden als Berichte über erfolgreiche Behandlungen der EAE.)

Bemerkenswert ist der Befund von Ross u. Mitarb., die mit nur 2maligen Prednisolon-Gaben einen Tag vor und am Tag der Immunisierung eine perakute Verlaufsform der EAE herbeiführen konnten. Die hierbei verabreichte relativ geringe Gesamtdosis spricht für einen immunologischen Wirkungsmechanismus. Die Ergebnisse von Ross u. Mitarb. werden von anderen Untersuchern nicht bestätigt (57), doch verwendeten diese bei ihren Untersuchungen entweder höhere Einzeldosen oder eine größere Gesamtdosis.

Daß 6-Mercaptopurin eine Steigerung der EAE-Intensität herbeizuführen vermag, wird von 2 Arbeitsgruppen unabhängig voneinander mitgeteilt (s. Tab. 4).

Beide berichten über die Zunahme vor allem der schweren Erkrankungen. Auch histologisch war die Intensivierung der EAE erkennbar.

Hingegen ist unter der Azathioprin-Behandlung mit der obigen Dosierung nur eine leichte Verkürzung der Inkubationszeit nachzuweisen. Eine Krankheitsverstärkung unter der Behandlung war nicht vorhanden.

Mit einer Röntgen-Ganzkörperbestrahlung läßt sich beim Meerschweinchen sowohl eine Verkürzung der Inkubationszeit als auch eine Zunahme der Erkrankungsschwere erreichen. Entsprechende Befunde wurden schon 1959 von Allegranza erhoben (2), der annahm, daß dieser Befund gegen die Hypothese einer allergischen Genese der EAE spreche.

An der Ratte konnten Allegretti und Mitarb. (3) ähnliche Ergebnisse erzielen. Zur Sensibilisierung der Tiere verwendeten sie ein Immunisierungsmaterial, das im Adjuvans 10mal weniger Tuberkelbazillen enthielt, als von Freund angegeben worden war. Nach einer Röntgen-Ganzkörperbestrahlung mit 600 R erkrankten nur die bestrahlten Tiere, unbestrahlte, immunisierte Kontrolltiere blieben gesund. Die Autoren vermuten, daß durch die Röntgenbestrahlung Mutanten von Immunzellen entstehen, die mit körpereigenen, aber auch mit eingebrachten Antigenen reagieren.

Alle obigen Befunde wurden mit einer Ausnahme am Meerschweinchen erhoben. Einige der verwendeten Antimetaboliten, die in den oben angegebenen Dosierungen bei anderen Species angewandt wurden, führten dort nicht zu einer Aktivierung der EAE (27, 64, 79, 81), sondern zu ihrer (partiellen) Besserung.

Die gleichen Antimetabolite können aber auch die EAE des Meerschweinchens abmildern oder gänzlich unterdrücken, wenn die Dosis und die Dauer der Behandlung geändert werden (79).

So konnten Field und Miller (56) beim Meerschweinchen mit täglichen Prednisolon-Dosen von 2 mg die EAE stark abmildern. Im Gegensatz zu Ross und Mitarb. (141) setzten sie jedoch ihre Therapie über den Tag der Immunisierung hinaus fort.

Gute Erfolge ebenfalls mit Prednisolon konnte Finger mit Tagesdosen von 3 mg erzielen. Auch hier wurde die Behandlung vom Tag der Immunisierung an über den Erkrankungsbeginn hinaus fortgeführt (57). Die Erfolge einer Cortisonbehandlung beim Meerschweinchen waren zweifelhaft (Brandriss u. a. 1965, 27); immerhin konnte die klinische Symptomatik vorübergehend gebessert werden.

6-Mercaptopurin, in Dosen von 50 mg/kg/Tag und 150 mg/kg/Tag vom Zeitpunkt der Immunisierung an über 9 oder 12 Tage gegeben, konnte die EAE bei den meisten Tieren unterdrücken und den Erkrankungsbeginn hinauszögern (Hoyer u. a. 1962, 78). Die Behandlung war sogar noch wirkungsvoll, wenn sie erst 7 Tage nach der Immunisierung begonnen wurde. Obwohl nach dem Absetzen der Behandlung noch Tiere mit zeitlicher Verzögerung erkrankten, war doch insgesamt ein bleibender Therapieerfolg zu verzeichnen.

Auch Azathioprin war bei der EAE des Meerschweinchen wirksam, wenn es entweder nach der Immunisierung vom +2. Tag an in Dosen von 5 bis 20 mg/kg täglich, oder in Dosen von 76 mg/kg/Tag vor der Immunisierung vom -7. Tag an verabreicht wurde. Keine klinischen Symptome einer EAE waren festzustellen; die Zahl der Versuchstiere war jedoch gering (64).

Die Röntgen-Ganzkörperbestrahlung führt hingegen beim Meerschweinchen immer zu einer Verstärkung der EAE. Dies liegt jedoch vielleicht daran, daß höhere Bestrahlungsdosen als die verwendeten für das Meerschweinchen tödlich

sind (52). Die wenigen Tiere, die bei Field (52) 300 und 450 R überlebten, zeigten keine verstärkte EAE.

Aus dieser Zusammenstellung geht folgendes hervor:

1. Antimetabolite, Glucocorticoide und Röntgen-Ganzkörperbestrahlung können die EAE sowohl abmildern oder verhindern als auch verstärken.
2. Die Art ihrer Wirkung hängt von der Höhe der Dosis und der Applikationsweise ab. Zur Verstärkung der EAE führen vornehmlich relativ geringe Dosen und der Behandlungsbeginn vor oder zum Zeitpunkt der Immunisierung. Hohe Dosen und Behandlungsbeginn nach der Immunisierung führen dagegen gewöhnlich zu einer Abschwächung der EAE.

Die Asparaginase ist nach unseren Ergebnissen ebenfalls in der Lage, die EAE des Meerschweinchens entweder abzumildern oder zu verstärken, je nachdem, mit welcher Dosis und in welchem Zeitraum sie angewendet wird. Daß aus der Anwendung von so hohen Asparaginase-Dosen wie 5 000 IU/kg und 7 000 IU/kg täglich eine Verstärkung der EAE resultierte, liegt vermutlich an der relativen Wirkungslosigkeit der Asparaginase beim Meerschweinchen.

Welche Mechanismen ermöglichen die ambivalente Wirkung immunsuppressiver Maßnahmen auf die EAE?

Ferraro und Cazzulo (48, 49) verminderten schon 1949 bei der Meerschweinchen-EAE die Erkrankungshäufigkeit und -schwere, indem sie vor der Sensibilisierung mit Meerschweinchenhirn in komplettem Freund'schen Adjuvans eine wässrige Suspension des gleichen Antigens intramuskulär injizierten.

Seitdem sind diese Ergebnisse vielfach bestätigt worden (84, 151, 163, 173).

Alvord und Mitarb. (7) unterscheiden 3 Typen der Hemmung der EAE mit zentralnervösen Antigenen:

1. Die Behandlung vor der Sensibilisierung (prevention; Herbeiführung einer Immundeviation).
2. Die Behandlung nach der Sensibilisierung, aber vor dem Ausbrechen der Erkrankung (suppression; Desensibilisierung).

3. Die Behandlung nach dem Auftreten der Lähmungen (therapy).

Mit einer Vielzahl von Antigenen läßt sich die EAE unterdrücken. Gesamtgehirn und -Rückenmark sind hierbei wirkungsvoller als Extrakte, homologes Rückenmark wirkungsvoller als heterologes (6). Eine starke Unterdrückung der EAE kann mit encephalitogenem Protein (7, 84, 151) erzielt werden, doch ist nach Einstein und Mitarb. (47) auch mit nicht-encephalitogenen Extrakten aus Rinderrückenmark beim Meerschweinchen eine Abmilderung der EAE zu erreichen.

Eine geringe Hemmwirkung wird auch mit komplettem Freund'schen Adjuvans alleine erzielt, wobei die Tuberkelbazillen das wirksame Agens darstellen.

Zur Wirkungsweise dieser Behandlung sind verschiedene Vorstellungen entwickelt worden: Für die Behandlungserfolge nach Beginn der Lähmungen hat man die direkte Interaktion zwischen verabreichtem Antigen und den sensibilisierten Lymphozyten verantwortlich gemacht (7). Für die Behandlung vor oder nach der Sensibilisierung gilt, daß durch sie die Antikörperbildung weitgehend ungestört bleibt, die zellulären Immunvorgänge dagegen unterdrückt werden. Das Wesentliche der 3 Typen der Unterdrückung der EAE ist also, daß durch sie die Herausbildung einer Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ gegen das EP verhindert wird (7). Dafür sprechen:

1. Das Negativwerden der Hautreaktion gegen das EP (170) und
2. die ungehinderte Wanderung der Makrophagen im Makrophagenhemmtest mit EP (59). Beides Reaktionen, die spezifisch zellgebunden ablaufende immunologische Reaktionen anzeigen.
3. Das Scheitern des Versuchs, die EAE mit Lymphknotenzellen von in dieser Weise behandelten Spendertieren auf Empfänger zu übertragen (59).

Hingegen kommt es bei den Tieren, die mit Hirngewebe oder EP behandelt wurden ähnlich wie bei solchen, die eine EAE überstanden haben zur Bildung einer Immunität.

Diese Tiere sind resistent gegen Versuche, mit einer Sensibilisierung eine EAE auszulösen.

Der Schutz gegen die EAE scheint an einen Serumfaktor, vermutlich einen Antikörper gebunden zu sein. Er ist mit dem Serum auf andere Tiere übertragbar, deren EAE nach der Sensibilisierung dann abgemildert verläuft oder völlig unterdrückt wird (116, 127, 129).

Welcher Art die Antikörper sind ist jedoch noch keineswegs klar.

Mit den üblichen Methoden sind Antikörper nicht in allen Fällen nachweisbar. Ihre Art und Menge scheinen darüber hinaus stark von der Art des Immunisierungsmaterials, besonders von seiner homologen oder heterologen Herkunft abzuhängen (116, 151).

Nach Paterson (129) besteht ein Zusammenhang zwischen dem Schutz gegen die EAE und dem Titer komplementbindender Antikörper.

Caspary und Mitarb. (37) fanden bei ihren Versuchen z. T. überhaupt keine komplementbindenden Antikörper, dagegen besteht nach ihnen eine gute Korrelation zwischen dem Titer der agglutinierenden Antikörper und dem Schutz gegen die EAE.

Auf Grund dieser Befunde haben Alvord und Mitarb. die Vorstellung entwickelt, daß Auftreten und Verlauf der EAE durch das Gleichgewicht von Kräften, die die EAE induzieren, und solchen, die ihrem Auftreten entgegenwirken bestimmt sind.

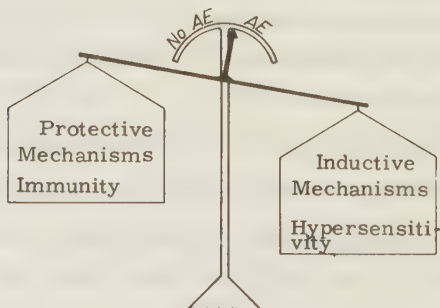


Abb. 13 Induktive und protektive Mechanismen in der EAE (Nach: Alvord und Ellsworth; 4)

Dieses Gleichgewicht kann nach dem oben Gesagten auch als ein solches zwischen Überempfindlichkeit und Immunität formuliert werden:

Neben der genetisch bedingten Reaktionslage der Versuchstiere wird es vor allem durch die Applikationsweise der Antigene beeinflusst. Der Grad, in dem die beiden Immunsysteme durch die Sensibilisierung angestoßen werden, bestimmt das Auftreten und die Intensität der nachfolgenden EAE.

Durch die Verwendung des Freund'schen Adjuvans bei der Sensibilisierung wird eine Immunreaktion vom Tuberkulin-Typ erreicht. Spritzt man hingegen Meer-schweinchen das Antigen ohne oder mit inkomplettem Freund'schen Adjuvans, so kommt es zu einer Immunitätsbildung (7).

In diesem Gleichgewicht von EAE-induzierenden und von protektiven Mechanismen, von Überempfindlichkeit und Immunität greift auch die immunsuppressive Behandlung mit Antimetaboliten oder Röntgenbestrahlung ein.

Es ist in Abhängigkeit von Dosis und Applikationsart eine Wirkung auf beide Immunsysteme zu erwarten:

Die Unterdrückung der Überempfindlichkeit vom Spättyp hat ein Ausbleiben der EAE oder eine Verminderung der Erkrankungsschwere zur Folge.

Eine Suppression des oder der protektiven Mechanismen hingegen führt zur Intensivierung der EAE, somit zu einer perakuten Verlaufsform. Möglicherweise ist das protektive Immunsystem (Immunitätsbildung) empfindlicher gegenüber der Behandlung mit Antimetaboliten und Röntgenbestrahlung, so daß schon geringe Dosen zu seiner Supprimierung und zur Verstärkung der EAE führen. Größere Dosen wirken dagegen gleichzeitig auf die Überempfindlichkeit vom Spättyp und mildern den Verlauf der EAE ab.

Die unterschiedliche Unterdrückung beider Immunsysteme durch die immunsuppressive Therapie bestimmt also, ähnlich wie ihre unterschiedliche Aktivierung durch die Sensibilisierung, Auftreten und Ablauf der EAE.

Der Hauttest

Wie vorstehend dargestellt, sind die Intensität der Hautreaktionen gegen Meerschweinchenhirngewebe und gegen das encephalitogene Protein vom Rind weitgehend unabhängig vom Verlauf der EAE.

Verschiedene Möglichkeiten hierfür sind möglich:

1. Das Meerschweinengehirn enthält neben dem EP andere Antigene, z. B. Lipide, die, nicht encephalitogen, nicht artspezifisch sondern organspezifisch sind.

Bei der Sensibilisierung mit Rinderrückenmark können auch gegen diese Antigene Immunprozesse ausgelöst werden, die dann bei der Hauttestung mit Meerschweinchenhirngewebe zu falsch positiven Ergebnissen führen können.

2. Das EP vom Rind ist keine chemisch einheitliche Substanz, sondern ein Gemisch von Proteinen unterschiedlicher Encephalitogenität. Bei der Sensibilisierung können die Meerschweinchen auch gegen Proteinbestandteile des EP immunisiert werden, die wenig oder nicht encephalitogen sind. Auch die Hauttestung mit dem EP vom Rind kann somit zu falsch positiven Reaktionen führen.

Die Ursache für die fehlende Korrelation zwischen EAE und Hautreaktion liegt also vermutlich in der Unreinheit der zur Testung verwendeten Antigene (36).

Nach Shaw und Mitarb. ist beim Meerschweinchen nur bei Verwendung eines homologen, wasserlöslichen encephalitogenen Proteins eine sichere Korrelation zwischen dem Ergebnis der Hauttestung und dem EAE-Verlauf zu erreichen (153).

E) Zusammenfassung

Bei 80 Meerschweinchen wurde durch die intrakutane Injektion von Rinderrückenmark in komplettem Freund'schem Adjuvans (Tuberkelbazillen, Typus humanus) eine allergische Encephalomyelitis induziert. 2 x 10 Meerschweinchen dienten als Kontrolltiere. Die anderen 60 Tiere wurden in Gruppen zu je 10 Tieren mit Asparaginase (Präparat der Firma Bayer, Handelsname Crasnitin) in verschiedener Dosierung entweder vor, zugleich mit, oder nach der Sensibilisierung behandelt. Eine weitere Gruppe 10 nicht-sensibilisierter Tiere wurde 3 Wochen lang mit 8000 IU/Tag Asparaginase behandelt und diente als negative Kontrolle.

Während eine Asparaginase-Behandlung mit 10 000 IU/kg/Tag, die am 7. Tag nach der Sensibilisierung begonnen wurde keinen Einfluß auf den Verlauf der EAE hatte, konnte mit der gleichen Dosis bei Behandlungsbeginn am Tag der Sensibilisierung der Krankheitsverlauf günstig beeinflußt werden (2 Untersuchungsgruppen).

Bei einer dieser beiden Untersuchungsgruppen erkrankten bis zum Ende der Therapie am +20 Tag nur 2 der 10 Tiere (Kontrollen: 19 von 20 Tieren), die Erkrankungsschwere war stark vermindert (Erkrankungsindex am +20. Tag 0,45; Kontrollen 2,1), keines der Tiere war gestorben (dagegen Kontrollen: 6 von 20 Tieren). Nach Absetzen der Asparaginase am 20. Tag kam es jedoch zur Verstärkung schon bestehender Erkrankungen und zu Neuerkrankungen bislang gesunder Tiere. Ein bleibender Behandlungserfolg war nicht sicher erkennbar.

Bei der anderen in gleicher Weise behandelten Untersuchungsgruppe war der Therapieerfolg weniger deutlich; immerhin wurde der Erkrankungsbeginn um durchschnittlich 1 Tag hinausgeschoben. Eine Milderung des EAE-Verlaufs war jedoch nicht sicher erkennbar.

Bei 2 Untersuchungsgruppen, die mit 5 000 IU/kg/Tag Asparaginase vom Tag der Sensibilisierung an bzw. mit 7 000/kg/Tag beginnend 7 Tage vor der Sensibilisierung behandelt wurden, kam es gegenüber den Kontrollgruppen zu einer ausgeprägten Verstärkung der EAE.

Während bei den Kontrollen bis zum 20. Tag 6 der 20 Tiere verstarben, waren es bei den so behandelten je 7 von 10 Tieren. Der Erkrankungsindex war mit 3,2 bzw. 3,35 gegenüber den Kontrollen (2,1) deutlich erhöht.

Die Asparaginase war auch in hohen Dosen für die Meerschweinchen gut verträglich, was auch das Wohlbefinden und die gleichmäßige Gewichtszunahme von 10,3 Wochen mit 8 000 IU/kg/Tag Asparaginase behandelten Meerschweinchen (negative Kontrollen) beweist.

Bei einer mit 10 000 IU/kg/Tag behandelten Gruppe (Therapiebeginn 7 Tage vor der Sensibilisierung) kam es zu schweren septischen Krankheitsbildern, denen die meisten Tiere erlagen. Wir werteten dies als einen Ausdruck der durch die Asparaginase-Behandlung hervorgerufenen Immunsuppression.

Ein vor Erkrankungsbeginn am 9. oder 10. Tag nach der Sensibilisierung mit der gleichzeitigen Einspritzung von encephalitogenem Protein aus Rinderrückenmark und einer Suspension von Meerschweinchengehirn durchgeführten Hauttest brachte keine verwertbaren Ergebnisse. Ein Zusammenhang zwischen der Stärke der Hautreaktionen und der Schwere der nachfolgenden EAE war nicht vorhanden.

In der Diskussion werden die möglichen Wirkungsweisen der Asparaginase auf die Entstehung der allergischen Encephalomyelitis behandelt, insbesondere werden die Ursachen für die Krankheitsverstärkung unter Asparaginase-Behandlung mit Hilfe der vorhandenen Literatur zu klären versucht. Die möglichen Gründe für das Versagen des Hauttestes werden erörtert.

F) Literatur

- 1 Adamson, R.H. and S. Fabro
Embryotoxic effect of L-asparaginase.
Nature 218, 1164 (1968)
- 2 Allegranza, A.
in: Kies, M.W. and E.C. Alvord, Jr., Eds.
"Allergic" encephalomyelitis.
C. C. Thomas, Springfield, Ill. 1959
- 3 Allegretti, N. and M. Matôsic
Experimental allergic encephalomyelitis in irradiated rats.
Nature 189, 500 (1961)
- 4 Alvord, E.C., jr.
Pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis:
introductory remarks.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 122, 245 (1965)
- 5 Alvord, E.C., K.R. Magee, M.W. Kies and N.P. Goldstein
Clinico-pathologic correlations in experimental "allergic" encephalomyelitis.
J. Neuropath. and Exp. Neurol. 18, 442 (1959)
- 6 Alvord, E.C., C.M. Shaw, W.I. Fahlberg and M.W. Kies
An analysis of various types of inhibition of experimental "allergic" encephalomyelitis in the guinea pig.
Z. Immunitätsf. 126, 217 (1964)
- 7 Alvord, E.C., C.M. Shaw, S. Hruby and M.W. Kies
Encephalitogen-induced inhibition of experimental allergic encephalomyelitis. Prevention, suppression and therapy
Ann. N.Y. Acad. Sci. 122, 333 (1965)

- 8 Amanullah Khan and Joseph M. Hill
 Suppression of skin hypersensitivity and antibody formation by
 L-asparaginase.
 J. Immunol. 104, 679 (1970)

- 9 Amanullah Khan, J. M. Hill and Mitsuo Adachi
 L-asparaginase in experimental auto-immune disease:inhibition of
 allergic encephalomyelitis.
 J. Immunol. 105, 256 (1970)

- 10 Astaldi, G., G.R. Burgio, G. Biscatti, A. Astaldi jr., L. Ferfoggia
 L-asparaginase and blastogenesis.
 Lancet 11 (1969), 643

- 11 Astaldi, G., G.R. Burgio, J. Krč, A. Astaldi Jr., V. Krčova und
 R. Genova
 L-asparaginase - ein Inhibitor der Transformation menschlicher
 Lymphozyten.
 Med. Klin. 65, 451 (1970)

- 12 Astaldi, G., G.R. Burgio, J. Krč, R. Genova, A. Astaldi jr.
 L-asparaginase and blastogenesis.
 Lancet 1 (1969), 423

- 13 Astaldi, G., D. Micu, A. Astaldi jr., G.R. Burgio
 Immunsuppressive action of L-asparaginase.
 Lancet 11 (1969), 1357

- 14 Barlow, C. F.
 A study of abnormal blood-brain permeability in experimental encephalo-
 myelitis.
 J. Neuropath. Exp. Neurol. 15, 196 (1956)

- 15 Bauer, K.
 Zur Biochemie der Asparaginase.
 Med. Klin. 64, 9 (1969)

- 16 Becker, F.F. and J.D. Broome
L-asparaginase: inhibition of early mitosis in regenerating rat liver.
Science 156, 1603 (1967)

- 17 Berenbaum, M.C.
Immunosuppression by L-asparaginase.
Nature 225, 550 (1970)

- 18 Berg, O., B. Källén
An "in vitro" gliotoxic effect of serum from animals with experimental
"allergic" encephalomyelitis.
Acta path. microbiol scand. 54, 425 (1962)

- 19 Berg, O., B. Källén
Studies of experimental allergic encephalomyelitis and multiple
sclerosis with aid of glia cell culture.
Acta neurol. scand. 41, 625 (1965)

- 20 Bertelli, A., L. Donati, E. Trabucchi jr.
Prolonged survival of allo and xeno-grafts of skin by means of antitumoral
compound : the L-asparaginase.
Arch. Ital. Pathol. Clin. Tum. 11, 475 (1969)

- 21 Biscatti, G., A. Astaldi jr., L. Ferfaglia, G.R. Burgio, G. Astaldi
With reference to the lymphocyte suppressive effect of E.coli
L-asparaginase.
Boll. Ist. Sieroter. Mil. 48, 502 (1969)

- 22 Bogdanove, L.H., G. Clark
The induction of exacerbations of allergic meningoencephalomyelitis
J. Neuropath. exp. Neurol. 16, 57 (1957)

- 23 Boll, J., U. Reckers
Die Beeinflussung der Proliferationskinetik normalen menschlichen
Knochenmarks durch L-Asparaginase.
in: Chemo- und Immunotherapie der Leukosen und malignen Lymphome.
Internationale Arbeitstagung. Wien 1969.

- 24 Bornstein, M.B., S.H. Appel
The application of tissue culture to the study of experimental "allergic" encephalomyelitis. I. Patterns of demyelination.
J. Neurol. 20, 141 (1961)
- 25 Boyse, E.A., L.J. Old, E. Stockert
Inhibitory effect of guinea pig serum on a number of new leukaemias in mice.
Nature 198, 800 (1963)
- 26 Brandriss, M.W.
Methotrexate : suppression of experimental allergic encephalomyelitis.
Science 140 , 186 (1963)
- 27 Brandriss, M.W., J.W. Smith, R.M. Friedman
Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by antimetabolites.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 122, 356 (1965)
- 28 Brockmann, J.A., A.V. Stiffey, W.C. Tesar
An in vitro assay for encephalitogenic components of central nervous tissue.
J. Immunol. 100, 1230 (1968)
- 29 Bromme, J.D.
Evidence that the L-asparaginase activity of Guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects.
Nature 191, 1114 (1961)
- 30 Broome, J.D.
Evidence that the L-asparaginase of Guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects.
J. exp. Med. 118, 99 (1963)

- 31 Broome, J.D.
Studies on the mechanism of tumor inhibition by L-asparaginase.
effects of the enzyme on asparagin levels in the blood, normal tissues,
and 603Hed lymphomas of mice: differences in asparagine formation and
utilization in asparaginase-sensitive and -resistent lymphoma cells.
J. exp. Med. 127, 1055 (1968)
- 32 Broome, J. D.
L-asparaginase: early finding and current studies on the metabolism of
L-asparagin in lymphoma cells.
in: Recent results in cancer research. vol 33, 1970
- 33 Broome, J.D., J.H. Schwartz
Differences in the production of L-asparagin in asparaginase-sensitive
and resistant lymphoma cells.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 138, 637 (1967)
- 34 Burgio, G.R., A. Astaldi jr., J. Krê, D. Micu, G. Astaldi
With reference to blastogenesis inhibition by L-asparaginase.
in: Recent results in cancer research. vol 33, 1970
- 35 Calne, D.B., S. Leibowitz
Suppression of EAE by cytotoxic drugs.
Nature 197, 1309 (1963)
- 36 Caspary, E.A., E.J. Field
Encephalitogenic factor in experimental allergic encephalitis.
Nature 197, 1218 (1963)
- 37 Caspary, E.A., R.E. Sinden, E.J. Field
Some observation on the role of circulating antibody in protection
against experimental allergic encephalomyelitis.
Z. Immun.-Forschung 130, 454 (1966)

- 38 Chakrabarty, A.K., H. Friedman
L-asparaginase-induced immunosuppression: effects on antibody-forming cells and serum titers.
Science 167, 869 (1970)
- 39 Condie, R.M., T. Nicholas
Effect of total body irradiation on the development of experimental allergic encephalomyelitis.
Fed. Proc. 21, 43 (1962)
- 40 Cutler, R.W.P., C.F. Barlow
Alterations in brain vascular permeability in allergic encephalomyelitis.
J. Neuropath. exp. Neurol. 26, 558 (1967)
- 41 Dartnall, J.A.
L-asparaginase and blastogenesis.
Lancet 11 (1969), 1357
- 42 Dartnall, J.A., A.G. Baikie
L-asparaginase and blastogenesis.
Lancet 1 (1969), 1098
- 43 David, J.R.
Macrophage migration.
Fed. Proc. 27, 6 (1968)
- 44 David, J.R., S. Al-Askari, H.S. Lawrence, L. Thomas
Delayed hypersensitivity in vitro. I. The specificity of inhibition of cell migration by antigens.
J. Immunol. 93, 264 (1964)
- 45 David, J.R., P.Y. Paterson
In vitro demonstration of cellular sensitivity in allergic encephalomyelitis.
J. exp. Med. 122, 1161 (1965)

- 46 Delage, J. M., J. Simard, G. Lehner-Netsch, A. Barry
L-asparaginase and complement.
Nature 233, 485 (1971)
- 47 Einstein, E. R., J. Csejty, W. J. Davis, H. C. Rauch
Protective action of the encephalitogen and other basic proteins in
experimental allergic encephalomyelitis.
Immunochemistry 5, 567 (1968)
- 48 Ferraro, A., C. L. Cazzullo
Prevention of experimental allergic encephalomyelitis in guinea pigs.
J. Neuropath. exp. Neurol. 8, 61 (1949)
- 49 Ferraro, A., C. L. Cazzullo
Prevention of experimental allergic encephalomyelitis in guinea pigs
(note II).
J. Neuropath. exp. Neurol. 8, 226 (1949)
- 50 Ferraro, A., L. Roizin, C. L. Cazzullo
Experimental studies in allergic encephalomyelitis, prevention and
production-note III.
J. Neuropath. exp. Neurol. 9, 18 (1950)
- 51 Ferraro, A., L. Roizin
Experimental allergic encephalomyelitis during and following cortone
acetate treatment.
J. Neuropath. exp. Neurol. 12, 373 (1953)
- 52 Field, E. J.
Effect of x-irradiation upon the development of experimental allergic
encephalomyelitis in guinea pigs.
Brit. J. exp. Path. 42, 303 (1961)
- 53 Field, E. J.
Experimental allergic encephalomyelitis.
Proc. Roy. Soc. Med. 54, 15 (1961)

54

Field, E.J.

Effect of Imuran on the susceptibility of guinea pigs to allergic encephalomyelitis.

Arch. int. Pharmacodyn. 165, 138 (1967)

55

Field, E.J., H. Miller

Studies in the inhibition of experimental allergic encephalomyelitis.

Arch. int. Pharmacodyn. 134, 76 (1961)

56

Field, E.J., H. Miller

Experimental allergic encephalomyelitis: comparison of protective effects of prednisolone and corticotrophine.

Brit. med. J. 5281, 843 (1962)

57

Finger, H.

Der Einfluß von Avil und Solu-Decortin H auf die experimentelle "allergische" Encephalomyelitis des Meerschweinchens und Kaninchens. Zschr. f. Ges. Exp. Med. 135, 276 (1961)

58

Fink, U., H. Begemann

Clinical studies with L-asparaginase in dermatomyositis.

in: Recent results in cancer research. vol. 33, 1970

59

Flad, H.-D., P.A. Miescher

Zelluläre Immunmechanismen bei der experimentellen Autoimmun-enzephalitis.

in: Autoimmunerkrankungen. Klinik und Therapie. Symposium in Rottach-Egern November 1968. Brendel, W., U. Hopf Hrsgb.

60

Frick, E.

Neuroallergie und multiple Sklerose.

Med. Klin. 62, 661 (1967)

- 61 Frick, E.
Untersuchungen zur Pathogenese der experimentellen allergischen
Encephalomyelitis.
Dtsch. Z. Nervenheilk. 183, 363 (1962)
- 62 Friedman, H.
L-asparaginase induced immunosuppression: inhibition of bone marrow
derived antibody precursor cells.
Science 174, 141 (1971)
- 63 Gallmeier, W.M., C.G. Schmidt, H.W. Stier
In vitro-Testung von Zellen auf Asparaginase-Empfindlichkeit.
in: Chemo- und Immunotherapie der Leukosen und malignen Lymphome.
Internationale Arbeitstagung. Wien 1969.
- 64 Girard, P.F., G. Aimard, H. Pellet
Les immunodépresseurs. I. Therapeutique immunodépressive en
neurologie.
Presse méd. 75, 967 (1967)
- 65 Grundmann, E.
Grundlagen der L-Asparaginase-Therapie.
in: Chemo- und Immunotherapie der Leukosen und malignen Lymphome.
Internationale Arbeitstagung. Wien 1969.
- 66 Grundmann, E.
L-Asparaginase und Leukämie.
Klin. Wschr. 47, 61 (1969)
- 67 Grundmann, E., H. J. Seidel
Die reparative Parenchymregeneration am Beispiel der Leber nach
Teilhепatektomie.
Handbch. allgem. Pathol. Bd. VI/2. Springer-Verl. 1969

- 68 Hall, J.G.
The partitioning of L-asparaginase between blood and lymph.
in: Recent results in cancer research. vol. 33, 1970
- 69 Hammer, C., W. Brendel, H. Furthmayr, R. Lamerz
Beruht die immunsuppressive Wirkung der L-Asparaginase auf dem
Prinzip des antigenen Wettbewerbs?
Vortrag, gehalten auf der 3. Tagung der Gesellschaft für Immunologie,
Marburg Oktober 1971. zit. nach "Abstracta", Marburg.
- 70 Haskell, C.M., G.P. Canellos, B.G. Leventhal, P.P. Carbone
L-asparaginase toxicity.
Cancer Res. 29, 974 (1969)
- 71 Heller, A., R. Gross
Zytochemische Veränderungen der Leukosen unter Asparaginasetherapie
in: Chemo- und Immunotherapie der Leukosen und malignen Lymphome.
Internationale Arbeitstagung. Wien 1969.
- 72 Hill, J. M., J. Roberts, E. Loeb, A. Khan, A. MacLellan, R.W. Hill
L-asparaginase therapie for leukemia and other malignant neoplasms.
J. Amer. med. Ass. 202, 882 (1967)
- 73 Hirschmann, W.-D., S. Seeber, P. Warnecke
In vitro-Untersuchungen mit E. coli-Asparaginase an lymphatischen
Rinderleukämiezellen und verschiedenen Transplantationstumoren.
Klin. Wschr. 47, 1217 (1969)
- 74 Hobik, H.P.
Immunsuppressive Wirkung von L-Asparaginase in der graft-versus-host-
Reaktion.
Naturwissenschaften 56, 217 (1969)
- 75 Holcenberg, J.S.
Guinea pig asparagin synthetase.
Biochim. biophys. Acta 185, 228 (1969)

- 76 Holcenberg, J.S., J. Pease
Asparagin synthesis in guinea pig liver.
Biochim. Biophys. Acta 158, 500 (1968)
- 77 Horowitz, B., B.K. Madras, A. Meister, L.J. Old, E.A. Boyse,
E. Stockert
Asparagin synthetase aktivty of mouse leukemias.
Science 160, 533 (1968)
- 78 Hoyer, L.W., R.M. Condie, R.A. Good
Prevention of experimental allergic encephalomyelitis with
6-mercaptopurine.
Proc. soc. Exp. Biol. and Med. 103, 205 (1960)
- 79 Hoyer, L.W., R.A. Good, R.M. Condie
Experimental allergic encephalomyelitis: The effect of 6-mercaptopurine.
J. exp. Med. 116, 311 (1962)
- 80 Hughes, D., E.J. Field
Inhibition of macrophage migration in vitro by brain and encephalitogenic
factor in allergic encephalomyelitis.
Int. Arch. Allergy 33, 45 (1968)
- 81 Kabat, E.A., A. Wolf, A.E. Bezer
Studies on acute disseminated encephalomyelitis produced experimen-
tally in rhesus monkeys VII. The effect of cortisone.
J. Immunol. 68, 265 (1952)
- 82 Kibler, R. F.
Large dose corticosteroid therapie of experimental and human
demyelinating diseases.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 122, 469 (1965)
- 83 Kidd, J.G.
Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of
normal guinea pig serum.
J. exp. Med. 98, 565 und 583 (1953)

- 84 Kies, M.W., C.M. Shaw, W.J. Fahlberg, E.C. Alvord jr.
Factors affecting the suppression of allergic encephalomyelitis by
homologous brain protein fractions.
Ann. Allergy 18, 849 (1960)
- 85 Kirchner, H., S. Bauer
Wirkung der L-Asparaginase aus Escherichia coli auf Phythämagglu-
tinin stimulierte Lymphozytenkulturen.
Klin. Wschr. 48, 50 (1970)
- 86 Kolb, L.C., A.G. Karlsson, G.P. Sayre
Prevention of experimental allergic encephalomyelitis by various agents.
Amer. neurol. Ass. 77, 117 (1952)
- 87 Komarek, A., F.M. Dietrich
Chemical prevention of experimental allergic encephalomyelitis in rats:
a quantitative evaluation of steroids and various non-steroids drugs.
Arch. Int. Pharmacodyn. 193, 249 (1971)
- 88 Koprowski, H., M.V. Fernandes
Autosensitization reaction in vitro. Contactual agglutination of sensitizes
lymph node cells in brain tissue culture accompanied by destruction of
glial elements.
J. exp. Med. 116, 467 (1962)
- 89 Lampert, P.W.
Demyeliation and remyelination in experimental allergic encephalomyeli-
tis. Further electron microscopy observations.
J. Neuropath. exp. Neurol. 24, 371 (1965)
- 90 Lampert, P.W., M.W. Kies
Mechanism of demyelinating in allergic encephalomyelitis. An electron
microscopy study.
Exp. Neurol. 18, 210 (1967)

- 91 Lamoureux, G., P.R. Carnegie, T.A. McPherson, D. Johnston
Experimental allergic encephalomyelitis: Immunological properties of
encephalitogenic polypeptides and proteins.
Clin. exp. Immunol. 2, 601 (1967)
- 92 Lamoureux, G., P.R. Carnegie, T.A. McPherson, J.R. Mackay,
C. Bernard
Mécanism d'action d'un polypeptide encéphalitogène dans l'induction
de l'encéphalite allergique expérimentale (EAE).
Ann. Inst. Pasteur 118, 562 (1970)
- 93 Land, W., E. Frick, R. Roscher, W. Brendel, A. Baethmann
Wirkung eines heterologen Antilymphozytenserums auf die experimentelle
allergische Encephalomyelitis.
Klin. Wschr. 47, 633 (1969)
- 94 Lauenstein, K., E. Grundmann, H.P. Hobik, W.-P. Madaus
Experimental immunosuppression with L-asparaginase.
in: Recent results in cancer research. vol. 33, 1970
- 95 Lechler, E., K. Schumacher, W.-D. Hirschmann
Gerinnungs- und Immunproteinveränderungen unter L-Asparaginase-
therapie.
Med. Welt 22, 127 (1971)
- 96 Lee, J.M., H.A. Schneider
Critical relationships between constituents of the antigen-adjuvant
emulsion affecting experimental allergic encephalomyelitis in a
completely susceptible muose genotype.
J. exp. Med. 115, 157 (1962)
- 97 Levine, S., E.M. Hoenig
Induced localization of allergic adrenalitis and encephalomyelitis at
sites of thermal injury.
J. Immunol. 100, 1310 (1968)

- 98 Levine, S., E.M. Hoenig, M.W. Kies
Allergic encephalomyelitis: Passive transfer prevented by encephalitogen.
Science 161, 1155 (1968)
- 99 Levine, S., E.M. Hoenig, M.W. Kies
Allergic encephalomyelitis: Immunologically specific inhibition of
cellular passive transfer by encephalitogenic basic proteins.
Clin. exp. Immunol. 6, 503 (1970)
- 100 Levine, S., R. Strebel
Allergic encephalomyelitis: Inhibition of cellular passive transfer by
exogenous and endogenous steroids.
Experientia 25, 881 (1969)
- 101 Levine, S., R. Strebel, E.J. Wenk, P.J. Harman
Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by stress.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 109, 294 (1962)
- 102 Levine, S., E.J. Wenk
Studies on the mechanism of altered susceptibility to experimental
allergic encephalomyelitis.
Am. J. Path. 39, 419 (1961)
- 103 Levine, S., E.J. Wenk
Induction of experimental allergic encephalomyelitis in rats without
the aid of adjuvant.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 122, 209 (1965)
- 104 Levine, S., E.J. Wenk
A hyperacute form of allergic encephalomyelitis.
Am. J. Path. 47, 61 (1965)

- 105 Levine, S., E. J. Wenk
Passive transfer of allergic encephalomyelitis: Acceleration by
adrenalectomy.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 121, 301 (1966)
- 106 Levine, S., E. J. Wenk, H. B. Devlin, R. E. Pieroni, L. Levine
Hyperacute allergic encephalomyelitis: Adjuvant effect of pertussis
vaccines and extracts.
J. Immunol. 97, 363 (1966)
- 107 Levine, S., E. J. Wenk, T. N. Muldoon, S. G. Cohen
Enhancement of experimental allergic encephalomyelitis by adrenalectomy.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. III, 383 (1962)
- 108 Lorke, D., D. Tettenborn
Experimental studies on the toxicity of Cranitin in animals.
in: Recent results in cancer research. vol. 33, 1970
- 109 Madaus, W. -P.
Die immunsuppressive Wirkung von L-Asparaginase in der Tuberkulin-
reaktion beim Meerschweinchen.
Klin. Wschr. 47, 1237 (1969)
- 110 Madaus, W. -P.
Nachweis der Antikörperhemmung durch L-Asparaginase mit Hilfe
der Agar-Plaque-Technik.
Klin. Wschr. 48, 240 (1970)
- 111 Maral, R., J. C. Guyonnet, L. Julou, Y. de Ratuld, G. H. Werner
Studies on the immunosuppressive activity of L-asparaginase.
in: Recent results in cancer research. vol. 33, 1970
- 112 Mashburn, L. T., L. M. Landin
Some physicochemical aspects of L-asparaginase therapie.
in: Recent results in cancer research, vol. 33, 1970

- 113 McCoy, T.A., M. Maxwell, E. Irvine, A.C. Sartorelli
Two nutritional variants of cultured Jensen sarcoma cells.
Proc. Soc. exp. Biol. 100, 862 (1959)
- 114 McElvain, T.J., S.K. Hayward
L-asparaginase and blastogenesis.
Lancet I (1969), 527
- 115 Moyer, A.W., G.A. Jervis, J. Black, H. Koprowski, H.R. Cox
Action of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in experimental allergic
encephalomyelitis of the guinea pig.
Proc. Soc. exp. Biol. 75, 387 (1950)
- 116 Nakao, A., E. Roboz-Einstein
Chemical and immunochemical studies with a dialyzable encephali-
togenic compound from bovine spinal cord.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 122, 171 (1965)
- 117 Nelson, S.D., M.R. Lee, J.B. Bridges
Immunosuppressive activity of L-asparaginase in mice.
Transplantation 9, 566 (1970)
- 118 Oerkermann, H., W.D. Hirschmann
Experimentelle Untersuchungen zur Wirkung der Asparaginase.
in: Recent results in cancer research. vol. 33, 1970
- 119 Oettgen, H.F., H.K. Schulten
Hemmung maligner Neoplasien des Menschen durch L-Asparaginase.
Klin. Wschr. 47, 65 (1969)
- 120 Ohno, R., M.D. Anderson
Inhibition of lymphocyte blastogenesis by L-asparaginase.
Proc. Soc. Amer. Ass. Cancer Res. 10, 66 (1969)

- 121 Old, L.J., E.A. Boyse, H.A. Campbell, G.M. Daria
Leukaemia-inhibiting properties and L-asparaginase activity of sera
from certain south american rodents.
Nature 198, 801 (1963)
- 122 Oldstone, M.B.A., F.J. Dixon
Immunohistochemical study of allergic encephalomyelitis.
Amer. J. Path. 52, 251 (1968)
- 123 Oppenheim, J.J.
Relationship of in vitro lymphocyte transformation to delayed hyper-
sensitivity in guinea pig and man.
Fed. Prov. 27, 21 (1968)
- 124 Osoba, D.
Restriction of the capacity to respond to two antigens by single
precursors of antibody-producing cells in culture.
J. exp. Med. 129, 141 (1969)
- 125 Paterson, P.Y.
Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node
cells.
J. exp. Med. 111, 119 (1960)
- 126 Paterson, P.Y., N.E. Beisaw
Effect of whole body x-irradiation on induction of allergic encephalomyelitis
in rats.
J. Immunol. 90, 532 (1963)
- 127 Paterson, P.Y., E.M. Coia, A.F. Jacobs
Complement-fixing anti-brain antibodies and allergic encephalomyelitis.
I. Characterization of the antibodies.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 122, 256 (1965)

- 128 Paterson, P.Y., M.A. Hanson, E.W. Gerner
Cyclophosphamide inhibition of experimental allergic encephalomyelitis in Wistar rats.
Proc. Soc. exp. Biol. 124, 928 (1967)
- 129 Paterson, P.Y., S.M. Harwin
Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in rats by means of antibrain serum.
J. exp. Med. 117, 755 (1963)
- 130 Paterson, P.Y., S.M. Harwin, N.C. Didakow
Acquired resistance to allergic encephalomyelitis and the role of a serum factor.
J. Clin. Invest. 40, 1069 (1961)
- 131 Patterson, M. K., jr.
Studies on the control of asparagine biosynthesis in mammalian tissues.
in: Recent results in cancer research. vol. 33, 1970
- 132 Patterson, M.K. jr., G.R. Orr
L-asparagine biosynthesis by nutritional variants of the Jensen sarcoma.
Biochim. Biophys. Res. Commun. 26, 228 (1967)
- 133 Pette, E. und H.
Zur Ätiopathogenese der Entmarkungsencephalomyelitis.
Klin. Wschr. 34, 713 (1956)
- 134 Prager, M.D., N. Bachynsky
Asparagine synthetase in normal and malignant tissues; correlation with tumor sensitivity to asparaginase.
Arch. Biochem. 127, 645 (1968)
- 135 Prager, M.D., J. Derr
Inhibition of primary antibody response by E. coli asparagine.
Nature 225, 952 (1970)

- 136 Pütter, J.
Pharmacokinetic behavior of L-asparaginase in men and in animals.
in: Recent results in cancer research. vol. 33, 1970
- 137 Rauch, H.C., O.L. Frick
Suppressive effect of antiallergic mediators on experimental encephalomyelitis.
Proc. Soc. exp. Biol. 124, 667 (1967)
- 138 Rauch, H.C., S. Raffel
Cellular activities in hypersensitive reactions. IV. Specifically reactive cells in delayed hypersensitivity: allergic encephalomyelitis.
J. Immunol. 93, 960 (1964)
- 139 Roberts, J., M.D. Prager, N. Bachynsky
The antitumor activity of Echerichia coli-L-asparaginase.
Cancer Res. 26, 2213 (1966)
- 140 Roscher, R.
Beeinflussung der experimentellen allergischen Encephalomyelitis mit heterologem Antilymphozytenserum bei der Ratte.
Dissertation, München 1969
- 141 Ross, J., H.J. Colmant, P. Böhm
Über die experirmentelle Encephalomyelitis des Meerschweinchens.
Dtsch. Z. Nervenheilk. 177, 475 (1958)
- 142 Scheinberg, L.C., J. M. Lee
Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in mice by irradiation of the target organ.
J. Neuropath. exp. Neurol. 27, 117 (1968)
- 143 Scheinberg, L.C., J.M. Lee, J.M. Taylor
Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in mice by irradiation of the target organ.
Nature 216, 924 (1967)

- 144 Schlag, W.
Die Wirkung der L-Asparaginase aus *E. coli* auf die Makrophagen-
Wanderungshemmung und die Lymphozyten-Transformation durch
Tuberkulin.
Klin. Wschr. 49, 1030 (1971)
- 145 Schmidt, C.G., W.M. Gallmeier
Zur Enzymtherapie der Leukämien.
Dtsch. med. Wschr. 93, 2299 (1968)
- 146 Schreck, R., W.C. Dolowy, R.N. Ammeraal
L-asparaginase: toxicity on normal and leukemic human lymphocytes.
Science 155, 329 (1967)
- 147 Schulten, H.K., G. Giraldo
Influence of L-asparaginase preparations of *E. coli* and Agouti serum
on the homograft reactivity in the mouse.
in: *Recent results in cancer research*. vol. 33, 1970
- 148 Schulten, H.K., G. Giraldo, E.A. Boyse, H.F. Oettgen
Immunosuppressive action of L-asparaginase.
Lancet II (1969), 644
- 149 Schwartz, M.K.
The distribution and clearance of L-asparaginase.
in: *Recent results in cancer research*. vol. 33, 1970
- 150 Schwartz, R.S.
Immunosuppression by L-asparaginase.
Nature 224, 275 (1969)
- 151 Shaw, C.M., E.C. Alvord jr., W.F. Fahlberg, M.W. Kies
Specificity of encephalitogen-induced inhibition of experimental
"allergic" encephalomyelitis in the guinea pig.
J. Immunol. 89, 54 (1962)

- 152 Shaw, C.M., E.C. Alvord, W.J. Fahlberg, M.W. Kies
Adjuvant-antigen relationships in the production of experimental
"allergic" encephalomyelitis in the guinea pig.
J. exp. Med. 115, 169 (1962)
- 153 Shaw, C.M., E.C. Alvord, J. Kaku, M.W. Kies
Correlation of experimental allergic encephalomyelitis with delayed-
type skin sensitivity to specific homologous encephalitogen.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 122, 318 (1965)
- 154 Sobin, L.H., J.G. Kidd
A metabolic difference between two lines of lymphoma 6C3HED cells
in relation to asparaginase.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 119, 325 (1965)
- 155 Sobin, L.H., J.G. Kidd
Alterations in protein and nucleic acid metabolism of lymphoma
6C3HED cells in mice given guinea pig serum.
J. exp. Med. 123, 55 (1966)
- 156 Stier, H.W., C.G. Schmidt, W.M. Gallmeier
Das Blutgerinnungssystem während der Leukämiebehandlung mit der
L.Asparaginase.
in: Chemo- und Immunotherapie der Leukosen und malignen Lymphome.
Internationale Arbeitstagung, Wien 1969.
- 157 Stone, S.H.
Transfer of allergic encephalomyelitis by lymph node cells in inbred
guinea pigs.
Science 134, 619 (1961)
- 158 Thomson, J.D., R.W. Austin
Effects of 6-mercaptopurine on susceptibility of guinea pigs to
experimental allergic encephalomyelitis.
Proc. Soc. exp. Biol. 111, 121 (1962)

- 159 Thomson, J.D., R.W. Austin, R.P. Streetman
The influence of chlorambucil on experimental allergic encephalomyelitis.
Neurology 13, 505 (1963)
- 160 Tower, D.-B., E.L. Peters, W.C. Curtis
Guinea pig serum-L-asparaginase.
J. biol. Chem. 238, 983 (1963)
- 161 Valovičová, E., J. Rajčáni, T. Tursky, M. Brozman
Asparaginase bei der experimentellen allergischen Encephalomyelitis.
Z. Ges. Exp. Med. 140, 256 (1966)
- 162 Waksman, B.H.
Experimental allergic encephalomyelitis and the "autoallergic" diseases.
Int. Arch. Allergy, Suppl. ad Vol. 14 (1959)
- 163 Waksman, B.H.
Allergic encephalomyelitis in rats and rabbits pretreated with nervous tissue.
J. Neuropath. exp. Neurol. 18, 397 (1959)
- 164 Waksman, B.H.
Further study of skin reactions in rabbits with experimental allergic encephalomyelitis. Reactions to tests with purified white matter fractions. Use of a quantitative technique for evaluating production of sensitization and disease by intradermal injection of antigen without adjuvant.
J. Infect. Dis. 99, 258 (1965)
- 165 Waksman, B.H., R.D. Adams
A histological study of the early lesions in experimental allergic encephalomyelitis in the guinea pig and rabbit.
Am. J. Path. 41, 135 (1962)

- 166 Waksman, B.H., L.R. Morrison
Tuberculin type sensitivity to spinal cord antigen in rabbits with .
isoallergic encephalomyelitis.
J. Immunol. 66, 421 (1951)
- 167 Warnatz, H., F. Scheiffarth, A. Scheder
Untersuchungen zur Wirkung von Antilymphozytenglobulin bei der
experimentellen allergischen Encephalomyelitis des Meerschwein-
chens.
Klin. Wschr. 48, 696 (1970)
- 168 Weiner, W.S., W.J. Waithe, K. Hirschhorn
L-asparaginase and blastogenesis.
Lancet II (1969), 748
- 169 Weksler, M.E., B.B. Weksler
Studies on the immunosuppressive properties of asparaginase .
Immunology 21, 137 (1971)
- 170 Wilkie, M.H., W. Kies, E.C. Alvord jr., C.M. Shaw
Homologous delayed-type skin responses and experimental allergic
encephalomyelitis (EAE) in guinea pigs.
Fed. Proc. 22, 671 (1963)
- 171 Wüthrich, R.
Probleme der EAE.
Bibl. Psych. Neurol. Fasc. 125. Karger, Basel, New York 1964
- 172 Wüthrich, R., H.P. Rieder, G. Ritzel
Beeinflussung der experimentellen allergischen Encephalomyelitis
durch -Aminocarbonsäure.
Experientia (Basel), 19, 421 (1963)
- 173 Zeman, W.
Untersuchungen zur Verhütung der experimentellen allergischen Ence-
phalomyelitis.
Dtsch. Zschr. f. Nervenheilk. 177, 451 (1958)

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. E. Frick und Dr. H. Angstwurm für die Einführung in das experimentelle Arbeiten und für zahlreiche Anregungen und Hinweise danken; ebenso Herrn Prof. Dr. H. Stickl, Direktor der Bayerischen Landes-Impfanstalt, in deren Räumen die tierexperimentellen Arbeiten durchgeführt wurden.

Besonderer Dank gilt auch Frau L. Scheid-Seydel für ihre Hilfe und für viele praktische Ratschläge.

Lebenslauf

Am 2. April 1947 wurde ich als Sohn von Rudolf Thiersch und seiner Frau Gertraud in Altötting geboren.

Volksschule und Gymnasium besuchte ich in Schwabach/Mfr., wo ich 1966 das Abitur bestand.

Zum Wintersemester 1966/67 schrieb ich mich in der Ludwig Maximilians-Universität zunächst als Hörer an der Philosophischen Fakultät ein. Nach zwei Semestern wechselte ich das Studienfach und studierte seit dem Wintersemester 1967/68 Medizin. Dieses Studium schloß ich im Sommer 1973 mit dem Staatsexamen ab.

